

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**“Control Epigenético-MicroARN de la
Migración de las Células de la Cresta Neural en
Vertebrados”**

TESIS

Para optar el título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga

AUTOR

Estefanía Sánchez Vásquez

ASESOR

Mónica Yolanda Paredes Anaya

LIMA-PERÚ

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**CONTROL EPIGENÉTICO-microARN DE LA
MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA CRESTA
NEURAL EN VERTEBRADOS**

Tesis para optar al Título Profesional de
Bióloga Genetista Biotecnóloga

AUTORA

Bach. Estefanía Sánchez Vásquez

ASESOR INTERNO

Dra. Mónica Yolanda Paredes Anaya

ASESOR EXTERNO

Dr. Pablo H. Strobl-Mazzulla

Lima – Perú

2015

En memoria de los participantes,
voluntarios e involuntarios, del experimento.

“A medida que la ciencia progresa y nuestros conocimientos se expanden, pensamos que lo comprendemos todo, y tendemos a volvernos sobreconfiados. Creo que siempre subestimamos la complejidad de la vida y de la naturaleza. El día de hoy es un día de celebración a esa belleza y esa complejidad”

Craig C. Mello
Co-descubridor del fenómeno de ARN de interferencia
en el día de su recepción del Premio Nobel de Fisiología o Medicina, 2006

DEDICATORIA

Al Laboratorio de Biología del Desarrollo (LBD), IIB-INTECH; todo esfuerzo tiene su recompensa. Al Dr. Pablo Strobl Mazzulla, por haberme embebido en el hermoso mundo del modelo aviar.

A la Dra. Mónica Paredes, por sus valiosos consejos. A la Dra. Juana del Valle, por ser una de las principales causantes de que este sueño se haga posible.

Asimismo, al profesor Fernando Retuerto, principal impulsor de la creación de la E.A.P Genética y Biotecnología. Las personas siempre se opondrán al cambio, pero sin él no se puede avanzar. Además, por sus consejos y sus formas de ver la vida, y ser la primera persona que me mostró la Biología del Desarrollo.

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica auspiciado por Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), subvención 008-2014-CONCYTEC-FONDECYT, por el apoyo brindado. Yo confío en mi país, el desarrollo es progresivo. Con granos de arena se puede hacer una montaña.

A la profesora Giovanna Sotil, por presentarme la interferencia mediada por ARNs pequeños. Al profesor Walter Vera que me introdujo en la Biología.

A mi familia, los amo mucho, gracias por volverme quien soy.

A todas las personas que de una u otra manera han contribuido en la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mi padre, yo ya tengo un clon, tú decía. Gracias por todo padre, y por siempre decirme FUERZA, solo eso bastaba.

A mi madre, por de una forma u otra, enseñarme que no importa que pase, siempre debes seguir adelante.

A mi hermana Antonina, solo con un hermano puedes sentir la total complementariedad.

A mi hermana Dina, gracias por hacer de mí una mejor persona, por cuidarme sin condiciones, por mostrarme que aunque no nos criamos juntas somos familia. A Nahum, el amor hacia un sobrino es algo indescriptible, te adoro. Al enano Alonso, que aunque lo hago renegar, yo sé que me quiere.

A mi familia entera, por la buena infancia que me dieron, en Baños del Inca en Cajamarca, por todas las travesuras que nos soportaron, la pandilla: Kevin, Antonina, Jhon Paul, Pepito, yo.

A mi colegio, "Cristo Rey" - Marista, ¡A Jesús por María! Gracias por enseñarme valores, respeto y a hacer las cosas con amor.

A Claw, por mostrarme lo que significa la amistad. Por traer al mundo a la cosita que más amo sin ser de mi sangre, Soren.

A Karina, creo que es la única que me entiende, eso nos gusta creer. Por todas las caminadas a tomar carro, por todas las lágrimas, por todas las travesuras, los seminarios, las prácticas, por todo lo que vivimos durante la carrera.

A todos mis amigos, los cuales no menciono por temor a olvidarme de alguno, pero que compartieron y compartiremos momentos alegres en nuestras vidas.

A casi todos mis profesores de la carrera, gracias por formarnos, por entregarnos los mejores conocimientos, por enseñarnos que se debe trabajar lo más duro posible, por entregarnos lo más valioso que se puede tener en el mundo, tiempo.

A todas las personas que conocí en el IIB-INTECH, Rosario, Verónica, Nayla, Sergio, Diana, Daniel, Freddy, Laura y en especial a Carlos; gracias por hacerme sentir en familia, gracias por las risas y los consejos. Gracias Argentina, país generoso.

Finalmente, a la energía que mueve el mundo, la vida.

ABREVIATURAS

3' UTR	3' Untranslated region (Región 3' no traducida)
%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNdc	ADN doble cadena
ADNsc	ADN simple cadena
AGO	Argonauta
ALB	Albumina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNdc	ARN de doble cadena
ARNm	ARN mensajero
BSA	Albúmina Sérica Bovina
cm	Centímetros
Cq	Ciclo de cuantificación
Da	Dalton
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNMT	ADN metiltransferasa
DNAsa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Desoxi ribonucleósidos tri-fosfato
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
g	Gramos
h	Horas
HCl	Ácido clorhídrico
K	Kilo
Kb	Kilobase
KCl	Cloruro de Potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de potasio
L	Litro
LB	Medio Luria broth
M	Molar
mA	Miliamperios
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
miARN	MicroARN
mL	Mililitros
mM	Milimolar
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato disódico
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramos
nt	Nucleótido

pb	Pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PBSw	PBS y 0,1% Tween20
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
RISC	RNA Induced Silencing Complex (Complejo de silenciamiento inducido por ARN)
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minutos
RQ	Relative quantity (cantidad relativa)
RT	Reverse transcription (transcripción reversa)
RT-qPCR	RT-quantitative PCR
SDS	Sodio dodecil sulfato
SFB	Suero fetal bovino
SSC	Solución salina de citrato de sodio
TBE	Tris/Borato/EDTA
TBS	Tris-buffered saline (<i>buffer</i> salino tris)
TEMED	Tetrametil etileno diamino
Tm	Melting temperature (temperatura de disociación)
Tris	Tris hidroximetil aminometano
U	Unidades
μL	Microlitros
UV	Ultravioleta
V	Voltios
W	Watts

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2. 1. Cresta neural	3
2. 2. Transición epitelio-mesénquima	5
2. 3. Regulación epigenética y microARNs	6
2. 4. Rol de la Regulación Epigenética y de los microARNs en el desarrollo de las CCN	9
3. OBJETIVOS	11
3. 1. General	11
3. 2. Específicos	11
4. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	11
V. MATERIALES Y MÉTODOS	12
5. 1. Material biológico	12
5. 2. Análisis <i>in silico</i>	12
5. 3. Patrón de expresión espacio-temporal del miR-203	12
5. 3. 1. Hibridación <i>in situ</i> (HIS) con sondas LNA	12
5. 3. 2. Extracción de ARN y Stem Loop RT-qPCR	15
5. 4. Metilación del contexto genómico de miR-203 en el desarrollo normal de la cresta neural	18
5. 4. 1. Secuenciación por bisulfito	18
5. 4. 1. 1. Tratamiento de ADN genómico con bisulfito	18
5. 4. 1. 2. PCR del contexto genómico de miR-203	19
5. 4. 1. 3. Ligación de insertos con vector pCR®2.1-TOPO	21
5. 4. 1. 4. Transformación de células <i>E. coli</i> quimiocompetentes con el vector pCR®2.1-TOPO y cultivo de colonias	22
5. 4. 1. 5. Selección de colonias positivas	23
5. 4. 1. 6. Secuenciación de colonias positivas	23
5. 5. Efecto de la pérdida de función del miR-203 en la migración de las células de la cresta neural	24
6. RESULTADOS	28
6. 1. Análisis <i>in silico</i>	28
6. 2. Patrón de expresión espacio-temporal del miR-203	31
6. 2. 1. Hibridación <i>in situ</i> con sondas LNA	31

6. 2. 2.	Stem Loop RT-qPCR.....	33
6. 3.	Metilación del contexto genómico de miR-203 en el desarrollo normal de la cresta neural.....	39
6. 4.	Efecto de la pérdida de función del miR-203 en la migración de las células de la cresta neural.....	40
7.	DISCUSIÓN.....	42
7. 1.	Los principales genes que regulan la TEM en las CCN son putativos blancos del miR-203	42
7. 2.	miR-203 se expresa de manera coincidente con su posible rol en la regulación de la TEM de las CCN.....	44
7. 3.	La metilación del ADN regula la represión de miR-203 en las CCN premigratoria.	45
7. 4.	La pérdida de función de miR-203 lleva a una migración prematura de las CCN	46
8.	CONCLUSIONES.....	48
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
10.	Material suplementario.....	62
10. 1.	ANEXO I - COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES	62
10. 2.	ANEXO II - COMPOSICIÓN MEDIOS DE CULTIVO	68
10. 3.	Tablas suplementarias.....	69

RESUMEN

Las células de la cresta neural (CCN) conforman una población transitoria presente solo en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario de vertebrados. Estas células se caracterizan por su multipotencia y capacidad migratoria, y es sabido que defectos en el proceso de migración lleva a severos trastornos congénitos conocidos como neurocristopatías. Las CCN, para adquirir sus propiedades migratorias, sufren un proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM), similar a lo que ocurre durante el inicio de la metástasis tumoral. Se ha determinado que los microARNs conforman un grupo de reguladores claves de la TEM tumoral. Considerando lo dicho, nos planteamos como objetivo determinar la existencia de una red regulatoria epigenética-microARN que desempeñe un papel importante en la migración de las CCN. Es así que, mediante análisis *in silico*, se encontró que los reguladores claves de la TEM en las CCN, tales como son los genes PHD12 y Snail2, son blancos tentativos del mismo miR-203. Al analizar la expresión de miR-203 mediante hibridación *in situ* y RT-qPCR se observó que se expresa fuertemente desde estadios muy tempranos en la placa neural y el tubo neural. Sin embargo, su expresión disminuye en el tubo neural dorsal coincidentemente con el inicio de la migración de las CCN. Por otra parte, se observó mediante secuenciación por bisulfito, que la región genómica de miR-203 se encuentra hipermetilada en las CCN pre-migratorias, a diferencia de la hipometilación encontrada en las células del tubo neural ventral y CCN migratorias. Finalmente, la pérdida de función de miR-203, utilizando un vector “esponja” de microARNs, lleva a una migración prematura de las CCN. Estos resultados en conjunto indican que la inhibición de la expresión de miR-203, mediante metilación del ADN, permite el aumento de la expresión de los genes PHD12 y Snail2 los cuales están directamente involucrados en la TEM de las CCN. Los resultados obtenidos en este proyecto pueden tener grandes implicancias que permitirán tener un mayor entendimiento sobre los errores que pueden conducir a un desarrollo anormal, así como también para comprender la metástasis tumoral.

PALABRAS CLAVE: TEM, cresta neural, miR-203, metilación, migración.

ABSTRACT

Neural crest cells (NCC) form a transient population present only in very early stages of embryonic development in vertebrates. These cells are characterized by multipotency and migratory ability, and it is known that defects in the migration process leads to severe congenital disorders known as neurocristopathies. NCC acquired their migratory properties by a process called epithelial-mesenchymal transition (EMT), similar to what happens during initiation of tumor metastasis. It has been determined that microRNAs are a group of key regulators during the EMT in tumor cells. Considering the above, we aimed to determine the existence of an epigenetic-microRNAs regulatory network that plays an important role in the migration of NCC. Thus, by *in silico* analysis, it was found that key regulators of EMT in NC, such as PHD12 and Snail2 genes, are both tentative targets of miR-203. By analyzing the expression of miR-203 by *in situ* hybridization and RT-qPCR it was found that it is strongly expressed at a very early stages on neural tissues, such as the neural plate and neural tube. However, its expression decreases in the dorsal neural tube at the time that NCC start their delamination from the epithelium. Moreover, it was observed, using bisulfite sequencing, that the genomic regulatory regions of miR-203 are hypermethylated in pre-migratory NCC, compared with the hypomethylation found in ventral neural tube and migratory NCC. Finally, the loss of function of miR-203, by using a vector encoding microRNAs sponges, leads into premature migration of NCC. Taken together these results indicate that inhibition of miR-203 expression by DNA methylation leads to increase their target genes PHD12 and Snail2 which are directly involved in the EMT process of NCC. The obtained results from this thesis may have major implications to understand the mistakes that can lead to abnormal NCC development, as well as the far reaching implications in the understanding of tumor metastasis.

KEYWORDS: TEM, neural crest, miR-203, methylation, migration.

1. INTRODUCCIÓN

Cada célula en un organismo multicelular contiene la misma información genética, sin embargo, son estructural y funcionalmente diferentes debido a la diferente expresión génica que las caracteriza (Rasmussen, 2014). Estas diferencias de expresión, las cuales se mantienen estables para caracterizar a una población celular, no afectan la información genética y son determinadas por la epigenética (Kiefer, 2007).

Durante el desarrollo embrionario, muchas de estas diferencias de expresión génica son producto de reguladores epigenéticos los cuales producen que células de un linaje determinado adquieran características específicas (Kiefer, 2007). Un claro ejemplo de ello sucede durante el desarrollo de una importante estructura denominada cresta neural (CN), la cual adquiere capacidad migratoria al someterse a un proceso denominado transición epitelio-mesénquima (TEM).

Si bien hasta el momento se conoce bastante sobre la red génica regulatoria (*Gene Regulatory Network*) que controla la TEM de las células de la cresta neural (CCN) (Sauka-Spengler & Bronner-Fraser, 2008a), poco se conocía acerca de los aspectos epigenéticos involucrados en dicho proceso. En este sentido, estudios pioneros muy recientes han demostrado que los mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN (Hu, Strobl-Mazzulla, Sauka-Spengler, & Bronner, 2012) y las modificaciones de las histonas (Strobl-Mazzulla & Bronner, 2012b; Strobl-Mazzulla, Sauka-Spengler, & Bronner-Fraser, 2010) son importantes reguladores de la TEM en las CCN. Por otro lado, se ha determinado que mecanismos moleculares similares a como ocurre en la TEM de las CCN se llevan a cabo durante la metástasis tumoral (Thiery, Acloque, Huang, & Nieto, 2009). Esto pone en evidencia la importancia de la comprensión de los mecanismos moleculares de dicho proceso.

Los microARNs comprenden especies de ARN no codificantes que regulan negativamente la expresión de genes a nivel post-transcripcional. Se ha determinado que durante la metástasis tumoral los reguladores epigenéticos

son capaces de regular ciertos microARNs para que se dé paso a la TEM (Diaz-Lopez, Moreno-Bueno, & Cano, 2014). Esta regulación epigenética de los microARNs parece reflejar un nivel adicional de coordinación fina en la red de regulación transcripcional de genes (Strobl-Mazzulla, Marini, & Buzzi, 2012). Sin embargo, hasta el momento, nadie ha descrito la existencia de este tipo de control epigenético-microARN durante el desarrollo embrionario.

Considerando lo expuesto, se propone establecer la existencia de un circuito regulador epigenético-microARN que desempeñe un papel importante durante la TEM de las CCN durante el desarrollo normal de vertebrados. Los resultados obtenidos durante la presente tesis podrían ayudar al entendimiento de los procesos que conducen a un desarrollo anómalo de las CCN. Además, también pueden ayudar a tener una mejor comprensión de la metástasis tumoral, debido a las similitudes entre ambos procesos migratorios.

2.MARCO TEÓRICO

2. 1. Cresta neural

La CN es una población transitoria de células multipotentes la cual se forma exclusivamente durante el desarrollo embriológico de vertebrados (Bronner, 2012). En estadios tempranos del desarrollo embrionario, la CN se induce en el borde de la placa neural, entre el ectodermo no neural y el neuroectodermo (Milet & Monsoro-Burq, 2012). Posteriormente, las CCN son especificadas en la región más dorsal del tubo neural y, al finalizar el proceso de neurulación, pierden su carácter epitelial y adquieren características mesenquimáticas. Este proceso conocido como TEM, es el que finalmente le confiere características migratorias a las CCN (Basch, Garcia-Castro, & Bronner-Fraser, 2004). Las CCN, en estado mesenquimal, migran largas distancias a lo largo de todo el embrión para llegar a diferentes sitios en donde se diferencian en una amplia gama de líneas celulares (Fig. 1), los cuales incluyen: neuronas y células de soporte del sistema nervioso periférico, melanocitos y células endocrinas, además contribuyen a la formación de gran parte de las estructuras del cráneo y cara (huesos y cartílagos) (Baker & Bronner-Fraser, 1997).

La importante contribución de las CCN en el desarrollo embrionario hace que los defectos en el desarrollo normal de las mismas estén asociados a una gran cantidad de patologías en humanos conocidas como neurocristopatías (Nakamura, 1995). Entre las patologías más comunes se encuentran: diversas malformaciones craniofaciales, neurofibromatosis tipo I, síndrome de Charge y síndrome de DiGeorge, entre otras; además, también están considerados diversos tipos de cánceres tales como melanoma, neuroblastoma, carcinoma de células de Merkel y neoplasia endócrina múltiple (Bonnomet et al., 2010; Hall, 2008). Es importante recalcar que, en particular, defectos en la TEM durante la migración de las CCN producen fenotipos más graves. Como es el caso de la enfermedad de Hirschsprung, trastorno motor del intestino consecuencia de un defecto en la migración de las CCN hacia el intestino distal, y presente en uno de cada 5,000 recién nacidos a nivel mundial (Tsai, Murakami, & Garipey, 2011).

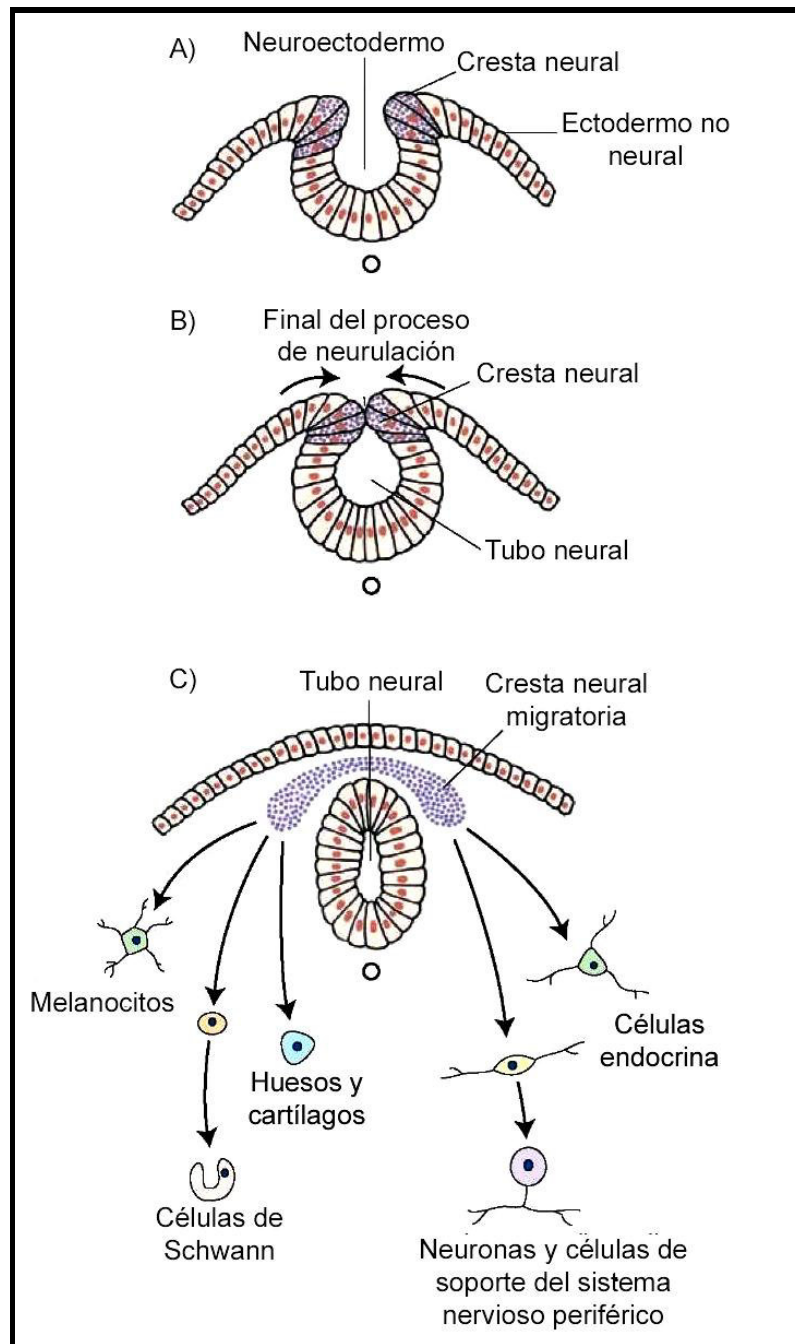


Figura 1: Desarrollo de la cresta neural: A) La CN se especifica en el borde de la placa neural, entre el ectodermo no neural y el neuroectodermo. B) Al finalizar el proceso de neurulación, las CCN residen en la parte más dorsal del tubo neural, para más adelante perder su carácter epitelial y adquieren características mesenquimatosas transformándose así en células migratorias. C) Las CCN migratorias, viajan largas distancias a lo largo de todo el embrión para llegar a diferentes sitios en donde se diferencian en una amplia gama de derivados. Adaptado de Development of the Nervous System (Gross Anatomy of the Brain, 2002).

En el Perú, las neurocristopatías que más se manifiestan en los recién nacidos son las anomalías craneofaciales; estas representan un importante problema con una incidencia de 15 de cada 1000 recién nacidos, y, a nivel mundial, es una de las causas principales de mortalidad infantil (Poletta, Castilla, Orioli, & Lopez-Camelo, 2007). Estas patologías tienen consecuencias graves a un nivel funcional, estético y social, las cuales son devastadoras para los niños y sus padres. Actualmente, la cirugía integral, la atención dental, la atención psicológica y la rehabilitación, pueden ayudar a aliviar algunos problemas específicos de los niños que sufren estas anomalías; sin embargo, estos tratamientos son costosos para los presupuestos nacionales de salud.

En los últimos años se ha determinado que ciertos factores ambientales, tales como consumo de alcohol y malnutrición durante el embarazo, contribuyen a la formación de neurocristopatías posiblemente por alteraciones en los mecanismos epigenéticos (Kim, Kang, & Kim, 2013). Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados no han sido aún dilucidados. Considerando lo dicho, y la extraordinaria variedad de neurocristopatías, es esencial entender a nivel genético, epigenético y celular, los distintos mecanismos que regulan el desarrollo de las CCN como un preludio a la comprensión de sus orígenes y la prevención o reparación de defectos asociados durante su desarrollo.

2. 2. Transición epitelio-mesénquima

La TEM es un proceso normal del desarrollo, conservado evolutivamente y que contribuye a la formación del esquema corporal, histogénesis y organogénesis entre otros (Acloque, Adams, Fishwick, Bronner-Fraser, & Nieto, 2009). Se realiza con el fin de que células con características epiteliales adquieran características mesenquimales (Kerosuo & Bronner-Fraser, 2012). Por ende implica profundos cambios fenotípicos que incluyen la pérdida de adhesión célula-célula, la pérdida de la polaridad celular, y la adquisición de propiedades migratorias e invasivas (Thiery et al., 2009).

Este importante proceso ocurre durante la migración de las CCN, la gastrulación en la línea primitiva, la descondensación de los somitos, la formación de la válvula cardiaca, etc. (Acloque et al., 2011). Por otro lado, es importante destacar que la TEM también ha sido implicada en diversas condiciones patológicas, tales como la fibrosis de órganos, y en cáncer, donde contribuye a la progresión del tumor y a la metástasis (Kalluri & Weinberg, 2009; Meng & Wu, 2012).

Actualmente se considera que las vías de migración de las células cancerígenas son una reminiscencia de las diferentes estrategias migratorias observadas durante el desarrollo del embrión (Mayor & Carmona-Fontaine, 2010). En este contexto, las CCN se han convertido en un modelo interesante para estudiar los mecanismos moleculares que rigen la TEM tumoral (Kerosuo & Bronner-Fraser, 2012; Theveneau & Mayor, 2012). Se ha descrito que las CCN y las células tumorales metastáticas muestran sorprendentes similitudes en términos de expresión génica y comportamiento general (Kerosuo & Bronner-Fraser, 2012; Strobl-Mazzulla & Bronner, 2012a; Theveneau & Mayor, 2012). Principalmente, los factores de transcripción tales como Snail, Twist, SoxE, FoxD y Ets (Foubert, De Craene, & Berx, 2010; Harris, Baxter, Loftus, & Pavan, 2010; Moreno-Bueno, Portillo, & Cano, 2008; Turner, Findlay, Moussa, & Watson, 2007), los cuales son esenciales para el desarrollo adecuado de las CNN (Sauka-Spengler & Bronner-Fraser, 2008a), se encuentran sobreexpresados en muchos tipos de cáncer.

2. 3. Regulación epigenética y microARNs

La Epigenética se puede definir como cambios heredables en un conjunto de células, los cuales no involucran mutaciones en el ADN (Kiefer, 2007). Existen diferentes tipos de mecanismos mediante los cuales ocurren los cambios epigenéticos: ARNs no codificantes, las modificaciones post-traduccionales de las histonas y la metilación del ADN en residuos CpG (Vogel & Lassmann, 2014).

La metilación del ADN cumple roles muy importantes durante el desarrollo de vertebrados al promover la represión de la transcripción de genes no específicos de linaje celular y así otorgar sus correspondientes características (Lande-Diner et al., 2007; Siegfried et al., 1999). Esta metilación establece patrones característicos entre diferentes tipos de células, y se produce por proteínas ADN metiltransferasas (DNMT) (Jaenisch & Bird, 2003). Las DNMT3A y DNMT3B son dos de estas proteínas las cuales producen la metilación específica *de novo* durante el desarrollo embrionario (Okano, Bell, Haber, & Li, 1999).

Los microARNs son una clase de pequeños ARNs no codificantes de tamaño entre 19-25 nucleótidos, que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional al unirse a sitios específicos en el extremo 3'UTR de su ARNm blanco (Ambros, 2001). En animales, la biogénesis de microARNs comienza con la transcripción de su gen, aproximadamente 1.000 nucleótidos, por la ARN polimerasa II o III para formar lo que se denomina pri-microARN (Ambros, 2001). Desde el pri-microARN, la ARNasa DROSHA (Lee et al., 2003), junto con la proteína DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*), cortan ciertos nucleótidos y generan un precursor de aproximadamente 60-70 nucleótidos. Este pre-microARN es luego transportado al citoplasma a través de la proteína exportina-5. Una vez allí, el pre-microARN es procesado por la enzima DICER para formar el microARN dúplex el cual es conducido hacia el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*). Este complejo está compuesto por diversas proteínas, entre las más importantes se encuentran la proteína argonauta 2 (AGO2), ARNasa que constituye el componente catalítico, y la proteína TRBP (*the human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein*), la cual facilita la unión al microARN. El complejo RISC elimina una cadena del microARN formando así el complejo RISC activo el cual usa al microARN para buscar a su ARNm blanco e inhibir su traducción o inducir su degradación (Fig. 2) (Ambros, 2001).

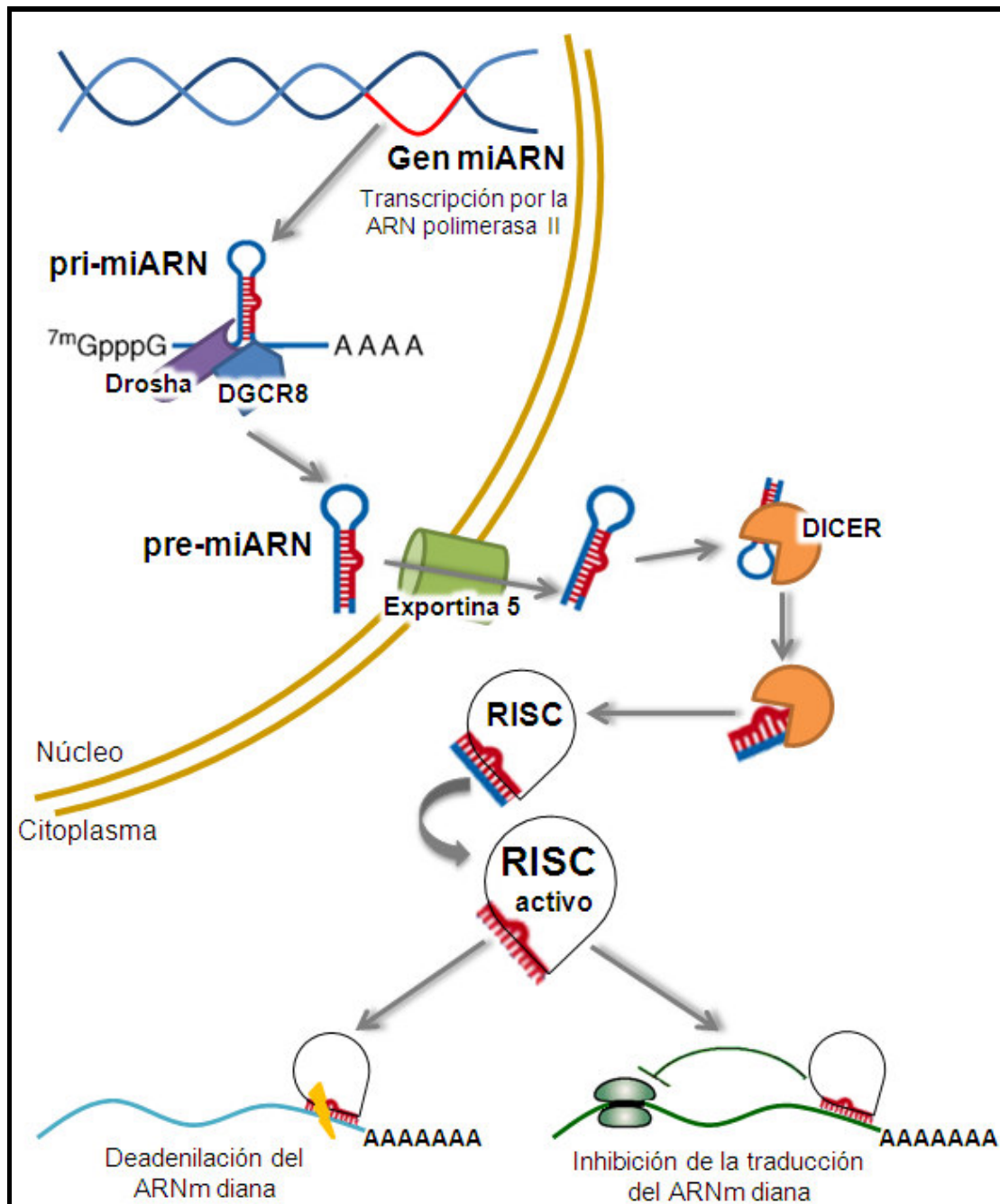


Figura 2: Biogénesis, procesamiento y acción de los microARNs.

Biogénesis: transcripción de un microARN por la ARN polimerasa II o III; el ARN transcrito luego se pliega denominándose pri-microARN. **Procesamiento:** desde el pri-microARN, la proteína DROSHA junto con la proteína DGCR8 cortan ciertos nucleótidos y generan un precursor denominado pre-microARN; este se transporta al citoplasma a través de la proteína exportina-5 donde es procesado por la enzima DICER para formar el microARN dúplex. DICER conduce al microARN dúplex hacia el complejo RISC el cual elimina una cadena del microARN dúplex formando así el complejo RISC activo. **Acción:** RISC activo usa al microARN para buscar a su ARNm diana e inhibir su traducción o inducir su degradación. (Creación propia).

La expresión de muchos microARNs se encuentra estrictamente regulada a nivel tejido y tipo celular específico, donde juegan papeles importantes durante el desarrollo, la diferenciación, la proliferación y la muerte celular (Alvarez-Garcia & Miska, 2005; Kloosterman & Plasterk, 2006). Se ha reportado que aproximadamente el 50% de las regiones genómicas en donde se ubican los microARNs están asociados a islas CpGs, y que la forma mayoritaria de regular su expresión es a nivel epigenético, mediante la metilación de las citosinas en estas islas (Weber, Stresemann, Brueckner, & Lyko, 2007). Este tipo de control epigenético-microARN es crucial para el correcto mantenimiento de la arquitectura genómica local y global, así como los patrones de expresión de genes (Wiklund, Kjems, & Clark, 2010). Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes y sus efectos generalizados son poco conocidos.

Investigaciones recientes han determinado que los microARNs cumplen un rol principal en la regulación de la TEM en cáncer (Diaz-Lopez et al., 2014). Al parecer, esta función se cumple mediante la regulación de la expresión de factores de transcripción que regulan la TEM, tales como Snail1/2 y Twist. Es importante recalcar que estos microARNs y factores de transcripción se encuentran fuertemente interconectados formando redes de retroalimentación negativa brindando señales de auto-refuerzo y robustez a la TEM, además, los mismos se encuentran regulados epigenéticamente (Jaenisch & Bird, 2003; Kiefer, 2007; Kiesslich, Pichler, & Neureiter, 2013; Kim et al., 2013).

2. 4. Rol de la Regulación Epigenética y de los microARNs en el desarrollo de las CCN

Múltiples mecanismos epigenéticos han sido descritos que actúan en la represión de marcadores epiteliales y la conversión a un estado mesenquimal durante la TEM (Kiesslich et al., 2013). En este contexto, se recalca la participación de las proteínas Snail, las cuales funcionan como principales mediadores de complejos epigenéticos modificadores de histonas, y cumplen sus funciones en la TEM al regular a diferentes tipos de caderinas: en cáncer, Caderina E (Cad-E) (Lin, Ponn, Hu, Law, & Lu, 2010) y en las CCN, Caderina 6b (Cad6b) (Strobl-Mazzulla & Bronner, 2012b).

En las CCN, Strobl-Mazzulla y colaboradores (Strobl-Mazzulla & Bronner, 2012b), describieron un complejo epigenético represor de la Cad6b, necesario para el inicio de la TEM. Este complejo está formado por las proteínas PHD12 (plant homeodomain 12), el complejo Sin3A/HDAC y la proteína Snail2, las cuales interactúan y se unen al promotor/potenciador del gen de la Cad6b. Esta unión se produce para deacetilar las lisinas presentes en las histonas H3 localizadas en el promotor y de esa forma inhibir su expresión. Estos resultados pusieron de manifiesto la coordinación de procesos epigenéticos y transcripcionales, los cuales confieren un nivel adicional de regulación fina durante el inicio de la TEM en la CN.

Por otro lado, en los últimos años se ha descubierto que las desregulaciones en las vías de control epigenético-microARN son eventos claves durante la activación patológica de la TEM en cáncer (Ahmad, Li, Bao, Kong, & Sarkar, 2014; Diaz-Lopez et al., 2014; X. M. Ding, 2014). En este contexto, se ha descrito que la expresión de Snail2 se encuentra finamente regulada mediante una vía de control epigenética-microARN en la cual la metilación en el promotor de miR-203 es clave para permitir su expresión y dar paso al inicio de la TEM tumoral (Taube et al., 2013). Sin embargo, poco se sabe sobre estas regulaciones durante el desarrollo de la CN.

Considerando la similitud entre la TEM que ocurre en la metástasis tumoral y durante la migración de las CCN; es posible que existan circuitos reguladores epigenético-microARN similares entre ambos modelos (Kerosuo & Bronner-Fraser, 2012). Es así que, por las razones anteriormente mencionadas, esta tesis busca estudiar este importante nivel de regulación epigenética-microARN durante el inicio de la migración de las CCN. La información adquirida entregará pistas, no solo sobre las regulaciones epigenéticas durante el desarrollo normal de la CN y sobre las anomalías durante su desarrollo, sino también sobre la metástasis tumoral.

3. OBJETIVOS

3. 1. General

Determinar la existencia de un circuito regulador epigenética-microARN que desempeñe un papel importante en la migración de las CCN.

3. 2. Específicos

- Identificar posibles microARNs capaces de regular a los principales genes involucrados en la TEM de las CCN.
- Caracterizar la expresión espacio-temporal de dicho(s) microARN(s).
- Determinar el rol de la metilación de ADN en la regulación espacio-temporal de dicho(s) microARN(s) y su relación con la migración de las CCN.
- Evaluar el efecto de la pérdida de función de dicho(s) microARN(s) y establecer su función en la migración de las CCN.

4. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Existe un circuito regulador epigenética-microARN involucrado en la regulación de la TEM de las CCN. En este circuito, la metilación de la región regulatoria de un microARN conlleva a su represión, permitiendo la adecuada expresión de los principales genes implicados en la TEM de las CCN.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5. 1. Material biológico

Para todos los experimentos, los huevos fertilizados de pollo (*Gallus gallus domesticus*) se obtuvieron de fuentes comerciales locales y fueron incubados a 37.8°C hasta obtener las etapas deseadas de análisis según los criterios de Hamburger y Hamilton (Hamburger & Hamilton, 1951).

5. 2. Análisis *in silico*

Se utilizaron los software de los programas TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) (Lewis, Burge, & Bartel, 2005) y miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) (Wang, 2008; N. Wong & Wang, 2014) para determinar los posibles microARNs que tengan como blancos tentativos a los genes PHD12 y Snail2.

Una vez determinado al miR-203 como posible regulador de ambos genes, se realizó un análisis de homología. Se obtuvo la secuencia de miR-203 de 22 especies (Tabla s. 1), de la base de datos de microARNs, miRBase (<http://www.mirbase.org/>) (Griffiths-Jones, 2006, 2010; Griffiths-Jones, Saini, van Dongen, & Enright, 2008). Posteriormente fueron alineadas en el programa ClustalX (Thompson, Gibson, & Higgins, 2002).

5. 3. Patrón de expresión espacio-temporal del miR-203

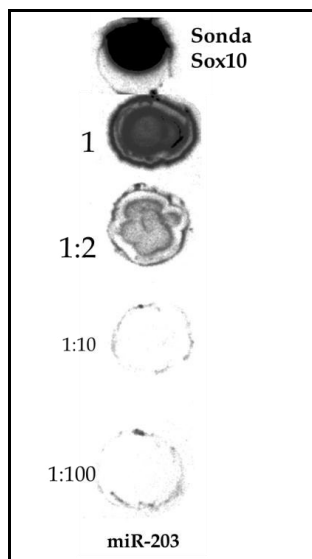
Se evaluó el patrón de distribución de miR-203 en diferentes estadios del desarrollo de embriones de pollo utilizando dos metodologías: hibridación *in situ* con sondas LNA y Stem Loop RT-qPCR.

5. 3. 1. Hibridación *in situ* (HIS) con sondas LNA

En primer lugar, se realizó un análisis de todo el embrión montado desde los estadios 4 hasta 10, mediante HIS con sondas LNA (locked nucleic acid) obtenidas de la empresa EXIQON (Wholemount *in situ* hybridisation with LNA probes, EXIQON). Las sondas LNA fueron marcadas en el extremo 3' utilizando

el kit DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit, 2nd generation (ROCHE), según especificaciones del fabricante. Una vez finalizada la reacción de marcación, se comprobó la eficiencia de la misma mediante un dot blot (Fig. 3)

Figura 3: Dot blot de la sonda LNA para miR-203 marcada con el kit DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit, 2nd generation (ROCHE). Se utilizó como control a una sonda ya marcada perteneciente a sox10. La eficiencia de la reacción de marcaje dio paso a concluir que el marcaje de la HIS es específico.



El protocolo para la realización de HIS con sondas LNA fue adaptado de los protocolos realizados por Darnell (Darnell et al., 2006) y Sweetman (Sweetman, 2011), según:

Colección y fijación: Los embriones fueron colectados en una placa Petri con medio Ringer frio durante 20 minutos. Pasado el tiempo, los embriones colectados son pasados a una placa Petri con PFA 4% frio y son dejados fijándose *overnight* a 4°C.

Deshidratación: Pasado el tiempo de fijación, los embriones fueron lavados tres veces con PBSw-DEPC durante 5 minutos, para luego proceder con la deshidratación utilizando concentraciones crecientes de metanol (25% MeOH + PBSw-DEPC; 50% MeOH + PBSw-DEPC; 75% MeOH + PBSw-DEPC; 100% MeOH) durante 10 minutos cada una. Posteriormente se dejaron los embriones en 100% MeOH por lo menos 1 hora a -20°C para finalizar la deshidratación.

Pre-tratamientos: Los embriones fueron rehidratados utilizando concentraciones decrecientes de metanol (100% MeOH; 75% MeOH + PBSw-DEPC; 50% MeOH + PBSw-DEPC; 25% MeOH + PBSw-DEPC) durante 10 minutos. A continuación se lavó con PBSw-DEPC 2 veces durante 20 minutos

para luego ser lavados 2 veces con solución de pre-hibridación por 20 minutos. Antes de la hibridación, los embriones son incubados durante al menos 2 horas en solución de pre-hibridación a 70°C.

Hibridación: La temperatura de hibridación para el miR-203 es 52°C; por ende, la solución de hibridación: sonda LNA para miR-203 en la solución de pre-hibridación, fue precalentada a esta temperatura antes de la incubación *overnight* con los embriones.

Lavados post-hibridación: La solución de hibridación para miR-203 fue removida y almacenada a -20°C para ser re-usada. Luego, se realizaron 3 lavados de 20 minutos con solución 2x SSC con 0.1% CHAPS a la temperatura de hibridación. Seguido de 3 lavados de 20 minutos con 0.2x SSC con 0.1% CHAPS a la temperatura de hibridación. Finalmente se lavó 2 veces por 10 minutos con MABT fresco a temperatura ambiente.

Hibridación con el anticuerpo: Los embriones fueron bloqueados con la solución de bloqueo por 3 horas. Seguidamente se incubaron con el anticuerpo Anti-Dig-AP (Roche), anticuerpo conjugado a la proteína fosfatasa alcalina, diluido en solución de bloqueo en una relación 1:2500, durante 16 horas a 4°C en constante agitación. Posteriormente, se realizaron 5 lavados de 1 hora en solución MABT a temperatura ambiente y un último lavado en MABT durante 16 horas en agitación a 4°C.

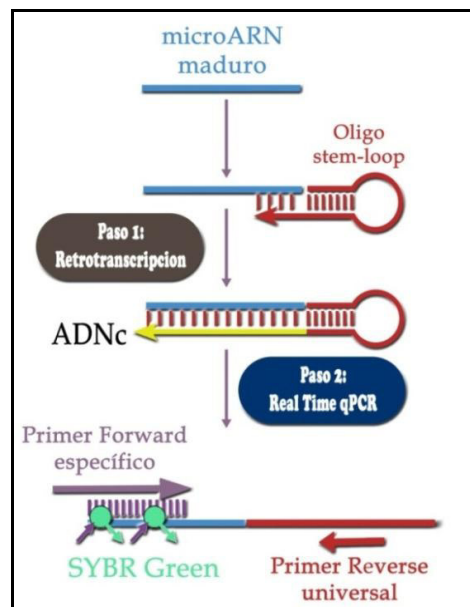
Revelado: Se realizaron 2 lavados por 30 minutos cada uno con TrisHCl 100mM (pH 9.5). Luego se lavó con solución NTMT durante 30 minutos. La reacción de revelado se realizó a temperatura ambiente con 4.5µL de NBT (cloruro de tetrazolio nito-azul) y 3.5µL de BCIP (sal de 5-bromo-4cloro-3'-indolifosfato p-toluidina) diluidos en 1mL de NTMT, protegiendo los embriones de la luz. Una vez obtenida la coloración deseada, la reacción fue detenida con 2 lavados de TrisHCl 100mM (pH 9.5) por 5 minutos cada uno. Luego se realizaron 3 lavados con PBSw durante 5 minutos cada uno. Finalmente, los embriones fueron deshidratados utilizando concentraciones crecientes de metanol y rehidratados para luego visualizarlos y fotodocumentarlos bajo lupa.

5. 3. 2. Extracción de ARN y Stem Loop RT-qPCR

En esta segunda metodología, se utilizó un tipo de PCR cuantitativo especial denominado Stem Loop RT-qPCR (Chen et al., 2005) para determinar las diferencias en el nivel de expresión en función del tiempo, desde el estadio 5 hasta el estadio 9.

Inicialmente, se extrajo la totalidad del ARN mediante un kit específico para enriquecer el aislamiento de genes microARN: RNAqueous®-Micro Kit (AMBION), según especificaciones del fabricante. Para la técnica de Stem Loop RT-qPCR, se diseñaron los oligonucleótidos stem-loop los cuales se unen a la región 3' del microARN maduro específico e inician la retrotranscripción. Luego, el producto es amplificado mediante Real Time PCR convencional, con cebadores diseñados específicamente para los microARNs estudiados y un cebador reverso universal que se une al stem loop (Fig. 4).

Figura 4: Descripción esquemática de la técnica Stem Loop RT-qPCR. La técnica incluye dos pasos: 1) Retrotranscripción con oligonucleótidos stem-loop y 2) cuantificación por PCR en tiempo real.



Antes de la determinación de la expresión génica mediante una cuantificación relativa, se realizó una selección de normalizadores adecuados para nuestro modelo, se testeó los niveles de expresión de miR-16 (Lardizabal et al., 2012) y let7b (Darnell et al., 2006; Glazov et al., 2008) como normalizadores de la expresión de miR-203; let7-b no ha sido antes utilizado como normalizador, sin embargo, así como con miR-16, se probó si su expresión se mantiene constante a través de los estadios analizados.

Una vez determinados los normalizadores adecuados para la cuantificación relativa de la expresión de miR-203, se procedió a la RT-qPCR utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 1.

Nombre	Secuencia
SLO-203	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC CAAGTG
SLO-16	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC CACCAA
SLO-let7b	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGAC AACCAC
miR-203 F	CCGGCGTGAAATGTTTAGG
miR-16 F	CGCCGCTAGCAGCACGTAAA
miR-let7b F	TCGCCGCTGAGGTAGTAGGTT
miR-UNI R	GAGGTATTCGCACCAGAGGA

Tabla 1: Cebadores utilizados en la técnica Stem Loop RT-qPCR.

Oligonucleótidos stem-loop (SLO) utilizados en la retrotranscripción y cebadores utilizados para la cuantificación por PCR en tiempo real. Se denota en negrita la secuencia específica para cada microARN analizado.

Retrotranscripción:

Previamente a la reacción de retrotranscripción, 1ug de ARN extraído se trató con el kit DNase I amplification grade (Invitrogen) en un volumen final de 10μL, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de ADNc, a cada muestra se adicionó 1μL del mix de los oligos stem-loop para miR-16, let7-b y miR-203 (1μM de cada oligo stem-loop) y 1μL de mix dNTP, Se calentó lo obtenido a 65°C por 5 minutos para luego, rápidamente, ponerlo en hielo. Se adicionó 4μL de 5x First-Strand *Buffer*, 2μL 0.1M DTT y 1μL RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40U/μL) (Invitrogen); se mezcló adecuadamente y se dejó incubando 2 minutos a 16°C. Pasado el tiempo se agregó 0.5μL de SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) para luego pasar a la reacción de retrotranscripción: incubación de 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C y 60 minutos a 50°C. Finalmente, se realizó la inactivación de la reacción al calentar 15 minutos a 70°C. Las muestras de ADNc finales se almacenaron a -20°C.

q-PCR:

Las reacciones de q-PCR se llevaron a cabo en un Termociclador Real Time: Stratagene™ Mx3005P qPCR Instrument utilizando FastStart Universal SYBR

Green Master (Rox) (ROCHE) como agente fluorescente. Para cada set de cebadores se calculó la eficiencia de amplificación (Nolan, Hands, & Bustin, 2006; Schmittgen & Livak, 2008) mediante la construcción de curvas estándares por la amplificación de diluciones seriadas de un mix de ADNc utilizando diferentes concentraciones de cebadores. Se graficaron los valores de Cq promedio para cada dilución de ADNc y para cada concentración de cebadores Vs el logaritmo del factor de dilución correspondiente. A partir de estos resultados se utilizó la concentración de cebadores que obtuvieron una eficiencia cercana al 100%. La amplificación específica de cada microARN se confirmó mediante la observación de un único pico en la curva de disociación y por la obtención de una única banda de tamaño esperado en una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Finalmente la mezcla de la reacción para analizar la expresión en los distintos estadios se realizó en un volumen final de 15uL según:

Concentración final cebadores:	miR-203 (F: 1.4µM-R:0.7µM)	miR-16 (F-R: 0.9µM)	Let7-b (F-R: 0.8µM)
2x SYBR Green Master mix	7.5µL	7.5µL	7.5µL
Cebador forward (10µM)	2.2µL	1.35µL	1.2µL
Cebador reverse (10µM)	1.1µL	1.35µL	1.2µL
ADNc	1µL	0.5µL	0.5µL
Agua UP	3.2µL	4.3µL	4.6µL

Las reacciones de q-PCR se iniciaron con 5 minutos de incubación a 95°C, seguida de 40 ciclos de 95°C por 20 segundos y 60°C por 1 minutos. Se realizó una curva de disociación al final de cada corrida dentro del rango de temperaturas 55°C-95°C, aumentando 0.5°C cada 2 segundos. La línea de base y el Cq se determinaron automáticamente utilizando el programa del termociclador. Por cada diferente reacción con un par de cebadores se incluyeron controles negativos (sin templados) y cada reacción se llevó a cabo por triplicado.

Análisis de datos

Se calcularon los valores de cantidad relativa (Milet & Monsoro-Burq) a partir de los Cq vía el método delta-Cq (Livak & Schmittgen, 2001), incorporando los valores de eficiencia de amplificación de qPCR calculados para cada gen (Pfaffl, 2001). Una vez obtenidos los valores de RQ, se procedió a graficar estos valores.

5. 4. Metilación del contexto genómico de miR-203 en el desarrollo normal de la cresta neural

Utilizando la técnica de secuenciación por bisulfito se determinó el patrón de metilación normal durante el desarrollo de la CN. Para ello se comparó el estado de metilación del contexto genómico de miR-203 del tubo neural dorsal, donde emerge la CN pre-migratoria, de la CN migratoria y del tubo neural ventral.

5. 4. 1. Secuenciación por bisulfito

La secuenciación por bisulfito es utilizada para el mapeo de metilaciones en los nucleótidos CpG. Inicialmente se extrae el ADN de interés para ser sometido a un tratamiento con bisulfito el cual actúa desaminando las citosinas del ADN convirtiéndolas en uracilo con excepción de aquellas que se encuentren metiladas. Después, mediante PCR se obtendrá la región que se quiere mapear para ser luego secuenciada. Finalmente, se comparará la secuencia obtenida con una secuencia control, que no ha sido sometido a la acción del bisulfito: aquellas citosinas que estuviesen metiladas aparecerán como citosinas en el control y en la muestra tratada, caso contrario, aparecerán sustituidas por una timina.

5. 4. 1. 1. Tratamiento de ADN genómico con bisulfito

Se disectaron tubos neurales dorsales y ventrales (n=5) de embriones en estadio 9 (7 somitas) y CCN migratorias a partir de embriones en estadio 12. Para el tratamiento con bisulfito se utilizó el kit EpiTect® Plus Bisulfite

Conversion kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como sigue:

- Se añadió a la muestra 15 μ L de tampón de lisis *FTB* y 5 μ L de proteinasa K y se incubó durante 30 minutos a 56°C.
- Conversión bisulfito: se agregó 85 μ L de *Bisulfite Mix* (disuelto) y 35 μ L de *DNA Protect Buffer*. Nota: la reacción debe virar de verde a azul después de la adición de *Bisulfite Mix*, lo que indica una mezcla suficiente y pH correcto para la reacción de conversión de bisulfito.
- Se realizó la reacción de conversión de ADN con bisulfito usando un termociclador, según el siguiente programa:

Condiciones del termociclador para la conversión de ADN con bisulfito	
95°C	5 minutos
60°C	25 minutos
95°C	5 minutos
60°C	85 minutos
95°C	5 minutos
60°C	175 minutos
20°C	10 minutos

- Una vez terminada la reacción de bisulfito, se llevó a cabo la purificación del ADN tratado mediante el uso de columnas de sílica siguiendo las instrucciones del fabricante.

Después de obtener el ADN tratado, se realizó la cuantificación de ADNss, los valores de la proporción 260/280 se encontraron cercanos a 2.2, lo que indica alta conversión del ADN tratado.

5. 4. 1. 2. PCR del contexto genómico de miR-203

A continuación del tratamiento del ADN con bisulfito, se procedió a amplificar la región regulatoria correspondiente al gga-miR-203. Inicialmente, con el fin de determinar qué región se analizará, se realizó la búsqueda de la localización de

islas CpGs en el contexto genómico de miR-203 usando la base de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) (Cunningham et al., 2014; Curwen et al., 2004; Hubbard et al., 2002). El análisis mostró que toda la secuencia del miR-203 se encuentra sobre una isla CpG.

Por otro lado, la metilación que regula microARNs ocurre principalmente en la región promotora, cercano al sitio de inicio de la transcripción (SIT) (Ha & Kim, 2014; Vrba, Munoz-Rodriguez, Stampfer, & Futscher, 2013; Wang et al., 2012; Weber et al., 2007); por ello, considerando el análisis anterior, se realizó una PCR anidada de dos regiones próximas al SIT de gga-miR-203 denominadas: región F1R1, de tamaño 235pb presenta 19 dinucleótidos CpG y se encuentra ubicada a 456pb antes del SIT de gga-miR-203; y región F3R3, de tamaño 252pb presenta 20 dinucleótidos CpG y se encuentra ubicada a 192pb antes del SIT más 26pb del gga-miR-203.

Las regiones F1R1 y F3R3 son determinadas por sets de cebadores utilizados en la PCR anidada (Fig. 5), los cuales fueron diseñados utilizando el programa Methyl Primer Express (Applied Biosystems):

Región	Secuencia	Región	Secuencia
F1R1		F3R3	
F	TTTATATTTGTTGAGGGGAAGG	F2	AGGTAGTTTGGAAAAATTGGTTT
R	TTTCCAAACTACCTTCTCCCTA	R2	CTCCTTTAAAAACATTACAACCC
F1	TTGTGTGAGGTTGGTAGTTAGG	F3	AAGTTTTGTTGTTGTTGTTATTTT
R1	ATCATCATCATCTAAACAACCC	R3	TAAACTATTAAAAACCACTACACCA

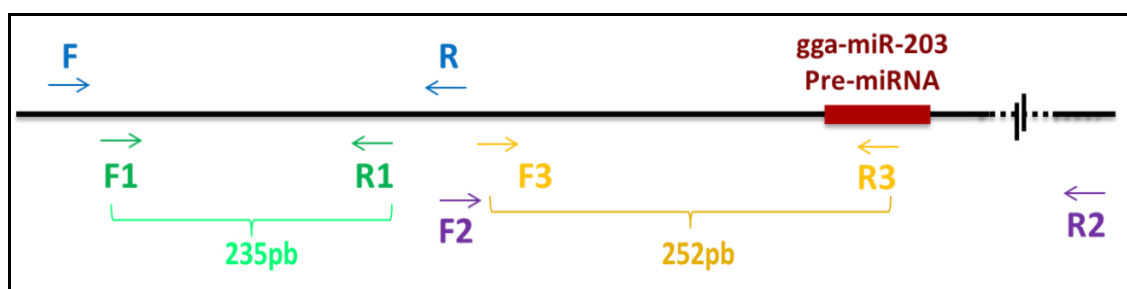


Figura 5: Localización espacial de los cebadores diseñados para la PCR anidada en el contexto genómico del gen gga-miR-203: se denota la división en dos regiones F1R1 y F3R3.

Las primeras reacciones de PCR se realizaron bajo el siguiente protocolo:

	1x
Agua UP	10.95µL
Cebador F o F2 (10µM)	0.15µL
Cebador R o R2 (10µM)	0.15µL
10x Buffer Taq DNA Polymerase (Roche)	1.5µL
Taq DNA Polymerase (Roche)	0.5µL
dNTPs (Roche)	0.2µL
DMSO	0.75µL
ADN de reacción con bisulfito	2µL
Volumen final	15µL

Protocolo de PCR:		
45 ciclos	95°C	5 minutos
	95°C	30 segundos
	50°C	1 minutos
	72°C	1 minutos
	72°C	7 minutos

La segunda reacción de la PCR anidada se llevó a cabo según:

	1x
Agua UP	10.95µL
Cebador F o F2 (10µM)	0.15µL
Cebador R o R2 (10µM)	0.15µL
10x Buffer Taq DNA Polymerase (Roche)	1.5µL
Taq DNA Polymerase (Roche)	0.5µL
dNTPs (Roche)	0.2µL
DMSO	0.75µL
ADN de reacción con bisulfito	2µL
Volumen final	15µL

Protocolo de PCR:		
45 ciclos	95°C	5 minutos
	95°C	30 segundos
	50°C	1 minutos
	72°C	1 minutos
	72°C	7 minutos

Una vez terminada la PCR anidada, se realizó una corrida electroforética de los productos de la reacción a 100 voltios por 45 minutos en un gel de agarosa 1% preparada en solución TBE 0.5X más Bromuro de etidio. Las muestras fueron sembradas con *buffer* de carga 6X. Para estimar el tamaño de los fragmentos esperados se utilizó el marcador de peso molecular de ADN de 1Kb plus (Invitrogen).

5. 4. 1. 3. Ligación de insertos con vector pCR®2.1-TOPO

Una vez identificadas las bandas correspondientes, las mismas fueron cortadas del gel con un bisturí y el ADN fue purificado mediante el kit AccuPrep® Gel

Purification Kit (Bioneer), siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, los fragmentos purificados fueron ligados al vector de clonado pCR®2.1-TOPO (Invitrogen) (Fig. 6), siguiendo el protocolo del fabricante.

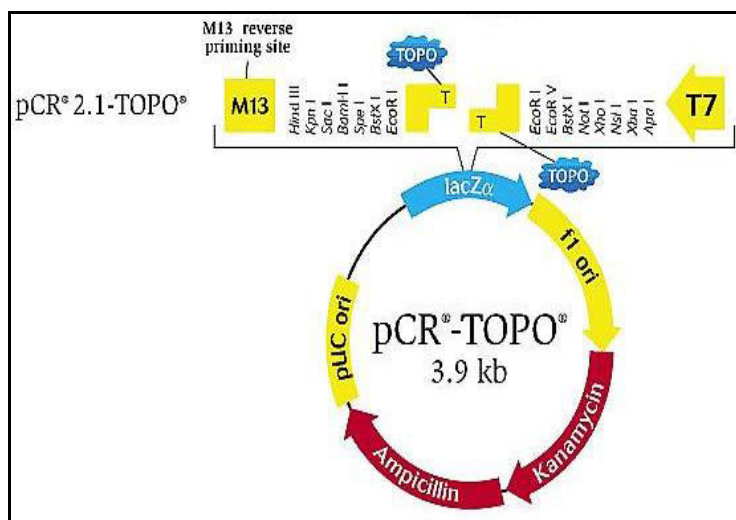


Figura 6: Descripción esquemática del vector pCR®2.1-TOPO. Se puede observar que el vector posee el gen de resistencia al antibiótico Ampicilina y sitios de unión a cebadores para la región M13 *reverse* y T7 *forward*.

5. 4. 1. 4. Transformación de células *E. coli* quimiocompetentes con el vector pCR®2.1-TOPO y cultivo de colonias

Con la ligación obtenida en el paso anterior se transformó bacterias quimiocompetentes *E.coli* DH5 Alfa. Para esto, se tomaron 50µL de bacterias quimiocompetentes a las cuales se le agregó, bajo condiciones de esterilidad, 5µL de la ligación. Esto se incubó 30 minutos en hielo, luego se le aplicó un shock térmico 30 segundos a 42°C y finalmente 5 minutos en hielo. Posteriormente se agregó bajo esterilidad 200µL de medio LB líquido y se incubó a 37°C en agitación durante 60 minutos.

Antes de sembrar la suspensión bacteriana en placas de Petri con medio LB agar más el antibiótico de selección ampicilina, se agregaron sobre la superficie del agar 8µL de IPTG (0.1M) y 40µL de X-Gal (50mg/mL) considerando las características del vector pCR®2.1-TOPO. Posteriormente se sembraron aproximadamente 150µL de la suspensión bacteriana incubada y las placas se dejaron crecer a 37°C *overnight*.

5. 4. 1. 5. Selección de colonias positivas

Las colonias positivas (blancas) fueron repicadas en 100µL del medio de cultivo LB líquido más ampicilina, e incubadas 1 hora a 37°C en agitación. Pasada la hora, se procedió a realizar la *colony PCR* con los cebadores *M13 reverse* y *T7 forward* (Fig. 6). Esta metodología sirvió para identificar qué colonias tenían el inserto del tamaño adecuado, y se llevó a cabo según:

	1x		
Agua UP	8.9µL		
Cebador <i>T7 forward</i> (10µM)	0.5µL		
Cebador <i>M13 reverse</i> (10µM)	0.5µL		
10x <i>Buffer HF2</i>	1.5µL		
Taq pol	0.1µL		
dNTPs (Roche)	0.5µL		
MgCl₂ (4mM)	1µL		
Colonia	2µL		
Volumen final	15µL		

	Protocolo de PCR:	
	95°C	5 minutos
35 ciclos	94°C	30 segundos
	50°C	30 segundos
	72°C	20 segundos
	72°C	5 minutos

5. 4. 1. 6. Secuenciación de colonias positivas

Se realizaron mini-preparaciones plasmídicas (minipreps) a partir de los clones positivos del punto anterior, según:

- Se tomó 3mL de un cultivo *overnight* en LB + antibiótico a 37°C para centrifugarlo 1 minutos a 10.000RPM.
- El pellet de bacterias obtenido fue resuspendido mediante vortex con 300µL de solución P1.
- Una vez resuspendido el pellet, se agregó 300µL de solución P2, y, mezclando muy suavemente por inversión (2-4 veces), posteriormente se incubó a temperatura ambiente no más de 5 minutos.
- Inmediatamente después, se agregó 300µL de solución P3, pre-enfriado en hielo, y se mezcló muy suavemente por inversión. Antes de ser incubado en hielo por 10 minutos.
- Pasado el tiempo se centrifugó 15 minutos a velocidad máxima. .

- Se transfirió 800 μ L del sobrenadante a un tubo de 1.5mL nuevo.
- Se agregó 3 μ L de RNasa A (10 mg/mL) y se incubó a 37°C por 30 minutos.
- Se agregó 400 μ L de cloroformo y se mezcló por inversión durante 30 segundos antes de centrifugar 5 minutos a velocidad máxima.
- Se recuperó muy cuidadosamente 730 μ L del sobrenadante (fase superior) en un tubo de 1.5mL nuevo, evitando llevarse parte de la interfase.
- Se precipitó el ADN agregando 700 μ L de isopropanol frío y se incubó en hielo por 30 minutos.
- Se centrifugó por 30 minutos a velocidad máxima y luego se eliminó completamente el isopropanol.
- Se lavó el pellet con 500 μ L de alcohol al 70 % frío.
- Se centrifugó por 5 minutos a velocidad máxima y luego se eliminó completamente el alcohol sobrenadante con pipeta antes de dejar secar al aire el pellet durante 5 minutos.
- El pellet fue resuspendido mediante vortex con un volumen de entre 30-100 μ L de agua UP.

Una vez obtenidos los ADN plasmídico purificados fueron enviados a secuenciar a la empresa Macrogen Inc. (<http://dna.macrogen.com/eng/>) en tubos de 1.5 μ L a un volumen de 20-30 μ L y concentración de 100ng/ μ L.

5. 5. Efecto de la pérdida de función del miR-203 en la migración de las células de la cresta neural.

Para analizar la función de miR-203 durante la migración de las CCN, se realizó la pérdida de su función mediante la electroporación de “esponjas” de microARNs en embriones de pollo.

Las “esponjas” de microARNs son señuelos artificiales que se introducen a las células mediante vectores de expresión y son un medio para crear fenotipos de pérdida de función para microARNs (Ebert & Sharp, 2010). Estas “esponjas” contienen múltiples sitios de unión para un microARN determinado en el extremo 3'UTR de un gen reportero, usualmente en el ARNm de la proteína

fluorescente verde (*Green fluorescent protein*, GFP), y su expresión es impulsada a un alto nivel por promotores fuertes.

Inicialmente se diseñó un vector “esponja” para miR-203, basándonos en el protocolo previamente descrito por Kluiver y colaboradores (Kluiver et al., 2012). El plásmido obtenido se denominó pSmir-203 (Fig. 7 F) y presenta 6 sitios complementarios al miR-203 en la región 3' UTR del ARNm de la proteína GFP. Este vector, después de ser electroporado, expresará el ARNm de GFP el cual será capaz de capturar a miR-203 endógeno y de esa forma inhibirá su función. Como control del experimento se utilizó un vector “esponja” de microARNs que tiene la secuencia de miR-203 al azar, denominados pScramble-miR-203.

La técnica de electroporación utilizada para transfectar vectores de expresión en estadios tempranos del desarrollo de embriones de pollo, se realizó siguiendo protocolos ya descritos con anterioridad (Sauka-Spengler & Barembaum, 2008) (Fig. 7 C). Ambos vectores, pSmir-203 y pScramble-miR-203 se electroporaron unilateralmente en estadio 4, y, pasadas 17 horas de cultivo *in vitro*, en el estadio 9 (6-7 somitas), se evaluó la expresión de Snail2 mediante inmunohistoquímica (IHQ).

Los embriones de pollo fueron extraídos mediante pinzas y tijeras de disección, en anillos de papel filtro y fueron lavados en solución isotónica Ringer's. Posteriormente los embriones fueron colocados en un electrodo negativo constituido por una placa de platino de unos 4mm, situado sobre una concavidad en una plataforma de silicona, esta concavidad fue llenada con la solución isotónica Ringer's (Fig. 7 A-B). Previamente a la inyección, los plásmidos fueron diluidos a una concentración de 2µg/µl a los cuales se les agregó colorante Fast Green (Sigma-Aldrich) para poder visualizarlos al momento de realizar la inyección.

Una vez ubicados adecuadamente los embriones, se procedió a la inyección unilateral de los plásmidos. La misma que se realizó utilizando microagujas de vidrio, bajo lupa y por presión de aire (Fig. 7 C). La inyección de los plásmidos

tuvo como objetivo ubicar la solución entre la membrana vitelina y el blastodermo, y longitudinalmente desde el nódulo de Hensen hasta el tejido extraembrionario, teniendo como punto de ingreso la zona límite entre las áreas pelúcida y opaca y como región blanco la placa neural. Es importante recalcar que el lado no electroporado del embrión sirvió como control interno (Fig. 7 D).

Una vez inyectados los vectores se colocó rápidamente un electrodo positivo sobre el embrión a una distancia entre electrodos de 8 mm (Fig. 7 A-B) para así, realizar la electroporación usando un electroporador que emite 5 pulsos de 5.5mV con una duración de 50 mili segundos a intervalos de 100 mili segundos. Una vez electroporados, los embriones, se ubicaron en placas de cultivo de 35 mm las cuales contenían albumina, para así cultivarlos *in vitro* (Fig. 7 C) en una incubadora a 37.8°C durante 15-17 horas, tiempo aproximado en el cual alcanzan el estadio 9 (6-7 somitas) (Fig. 7 E).

Para el análisis de cómo afecta la pérdida de función del miR-203 a la migración de las CCN se evaluó la expresión de la proteína Snail2 mediante IHQ (Taneyhill, Coles, & Bronner-Fraser, 2007). Pasado el tiempo de incubación de los embriones electroporados, se procedió a fijar con PFA 4% por 2 horas a 4°C. Continuando con 3 lavados de 15 minutos con TBSt. Para luego bloquearlos con solución de bloqueo: TBSt más 5% SFB (suero fetal bovino) durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se incubó *overnight* a 4°C con el anticuerpo primario anti-Snail2 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa University; clone 62.IE6) diluido en la solución de bloqueo en la proporción 1:50. El anticuerpo primario fue lavado 4 veces durante 15 minutos con TBSt antes de ser reemplazado con el anticuerpo secundario Alexa Fluor goat anti-mouse IgG1 594 (Molecular Probes) diluido en la solución de bloqueo en proporción 1:500 durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, los embriones fueron lavados 4 veces durante 15 minutos con TBSt antes de ser fotografiados en un microscopio de fluorescencia.

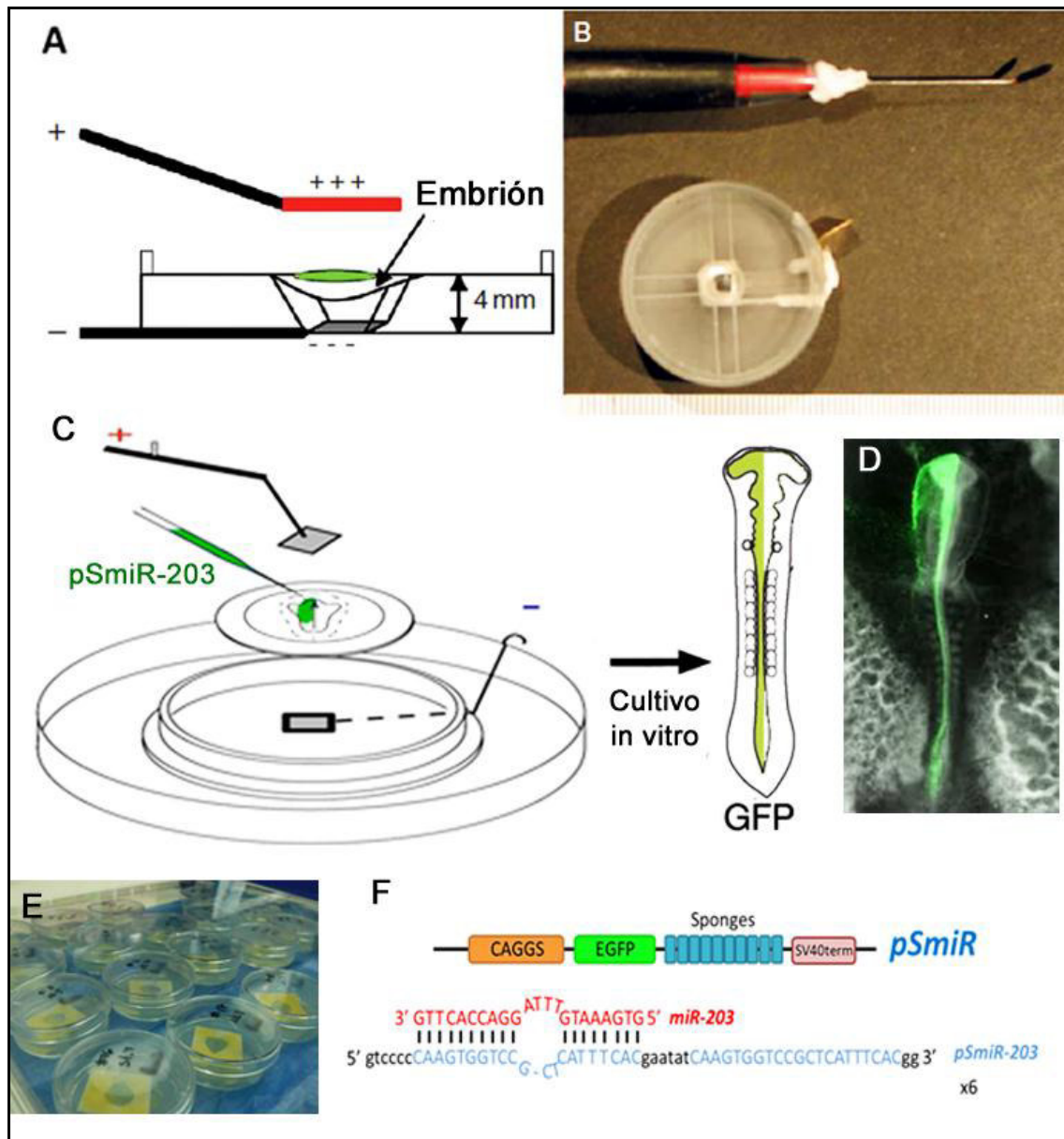


Figura 9: A) Representación esquemática del aparato utilizado para la electroporación ex-ovo en embriones del estadio 4 a 7. B) El Aparato de electroporación consiste en el electrodo de platina y una cámara de electroporación en forma de plato petri cubierta en el fondo con una fina capa de platino. C) Electroporación ex-ovo en embriones de pollo. Disposición de los electrodos positivo (+) y negativo (-), microagujas y el embrión dispuesto ventralmente. D) Embrión de pollo electroporado unilateralmente con un vector plasmídico conteniendo el gen reportero GFP. E) Embriones electroporados dispuestos en las placas de cultivo. F) Representación esquemática del vector “esponja” pSmiR-203.

6. RESULTADOS

6. 1. Análisis *in silico*

Con la finalidad de determinar posibles microARNs que tenga como blancos tentativos a los reguladores claves de la TEM en las CCN, PHD12 y Snail2 (Strobl-Mazzulla & Bronner, 2012b), se realizó un análisis *in silico* en las principales bases de datos de microARNs.

El análisis bioinformático sugirió la existencia de una relación potencial por parte de miR-203 en la regulación de PHD12 (Fig. 8) y Snail2 (Fig. 9). Es importante recalcar que PHD12 posee solo un sitio de unión conservado a miR-203 mientras que Snail2 presenta dos sitios de unión, uno conservado y otro pobremente conservado.

miR-203 es considerado un regulador clave de la TEM en tumorigénesis (Taube et al., 2013). Esta coincidencia, de que dos de los genes claves de la TEM en CCN sean regulados por miR-203, además de la función que cumple en cáncer, nos llevó analizar en más detalle su conservación en el linaje de los vertebrados. Un alineamiento múltiple de 22 especies que caracterizan los diferentes linajes mostró que efectivamente miR-203 se encuentra completamente conservado en su región “semilla”, región que abarca los nucleótidos del 2 al 7 desde el extremo 5' de los microARNs maduros y que otorga especificidad al microARN pues dichos nucleótidos deben ser obligatoriamente complementarios al ARNm diana (Fig. 10). Esto nos indica que la función de este microARN es muy importante y que podría también estar conservada entre diferentes especies de vertebrados.



Figura 9: Análisis *in silico* realizado para Snail2. Se muestran las salidas de las bases de datos miRDB y TargetScan, para el análisis de relación entre gga-miR-203 y Snail2.



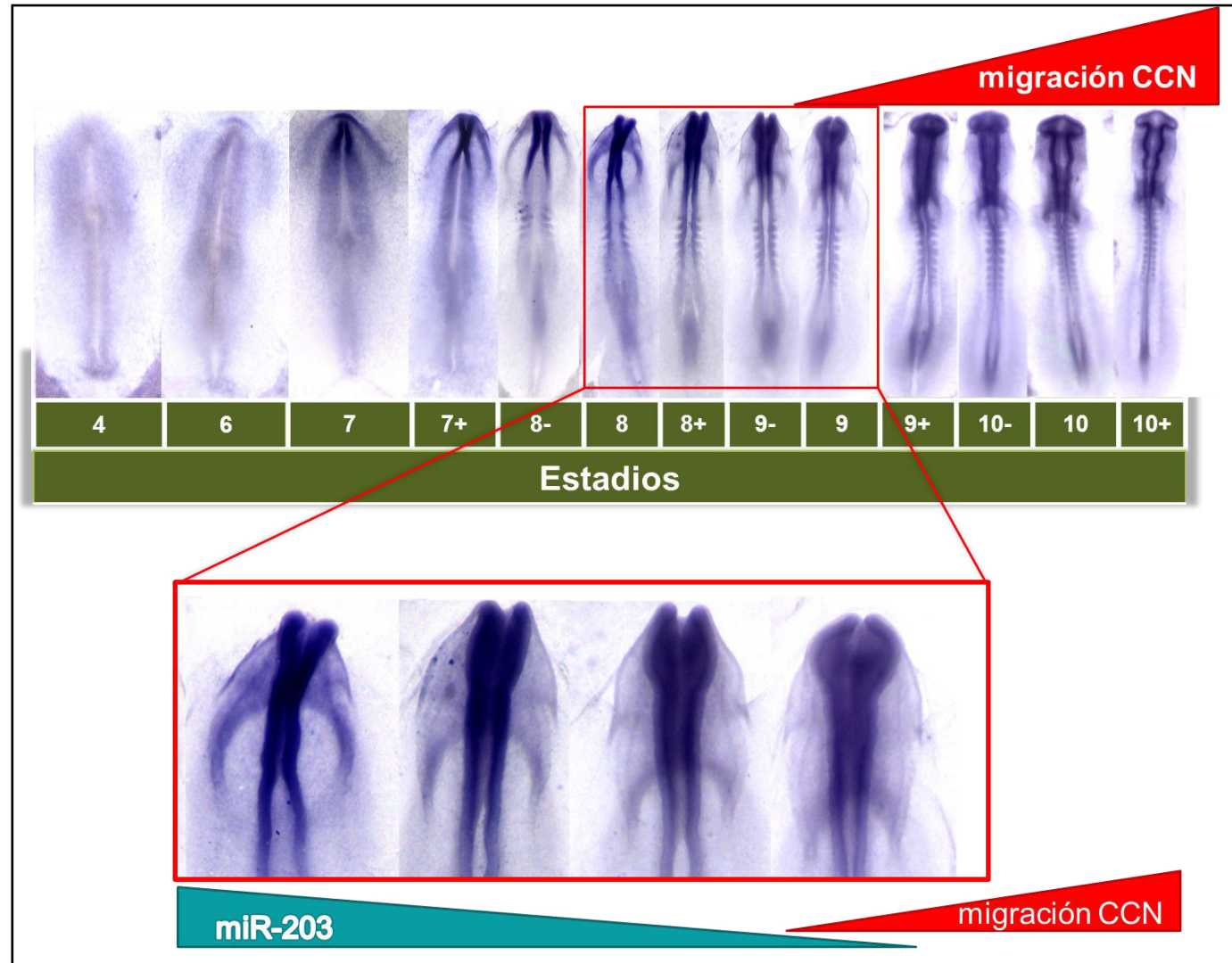
Figura 10: Alineamiento múltiple de la secuencia de miR-203 en vertebrados. La descripción de las 22 especies analizadas se encuentra en la tabla suplementaria 1. La flecha roja señala la secuencia de miR-203 en *Gallus gallus*, mientras que la flecha azul señala la secuencia de miR-203 en *Homo sapiens*. La región “semilla” de miR-203 se encuentra enmarcada en amarillo. Las secuencias enmarcadas en rojo corresponden a las especies que tienen la secuencia del gga-miR-203 de forma idéntica.

6. 2. Patrón de expresión espacio-temporal del miR-203

6. 2. 1. Hibridación *in situ* con sondas LNA

Con el fin de estudiar el patrón de expresión del miR-203 en los estadios tempranos del desarrollo, especialmente durante el desarrollo de las CCN, se realizaron HIS con una sonda LNA específica para miR-203. Los embriones analizados abarcaron desde el estadio 4 hasta el estadio 10 (Hamburger & Hamilton, 1951). Analizando las regiones del embrión en estos estadios, se denota que la expresión de miR-203 desde el estadio 4 se produce en el ectodermo, placa neural y borde de la placa neural, lugar donde se especifican las CCN. La expresión es muy marcada en los pliegues neurales hasta el estadio 8 y luego esta expresión va atenuándose en estadio 9-10, momento en el cual las CCN comienzan la TEM para su posterior migración (Fig. 11).

Figura 11: Análisis estadio-específico de la expresión de miR-203 mediante hibridación *in situ* con sonda LNA. Se muestra el patrón de expresión del gen gga-miR-203 en embriones de pollo desde el estadio 4 hasta estadio 10. miR-203 se expresa desde el estadio 4 en el ectodermo neural y no neural y, a partir del estadio 8 en la región del tubo neural. En la imagen se recalca como a partir del estadio 9 empieza a disminuir la señal del miR-203, lo que concuerda con el inicio de la migración de las CCN.



6. 2. 2. Stem Loop RT-qPCR

Con el fin de tener información cuantitativa de los niveles de expresión de miR-203 se realizaron RT-qPCR durante diferentes momentos del desarrollo y específicamente durante el desarrollo de las CCN. Para esto, inicialmente, se requirió una exhaustiva puesta a punto de la búsqueda y determinación de normalizadores.

Considerando las características de los microARNs, en general, el ARN ribosomal U6 es utilizado, sin embargo, nosotros decidimos utilizar microARNs. Para ello se seleccionó al miR-16 ya reportado como un adecuado normalizador en cáncer (Lardizabal et al., 2012) y por bibliografía, en el modelo aviar, se denotó la expresión constitutiva de let7b (Darnell et al., 2006; Glazov et al., 2008).

Para determinar si, en nuestro modelo, estos dos microARNs funcionarían como buenos normalizadores se midió su expresión en todos los estadios analizados y la información se introdujo en el programa BestKeeper (<http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html>) (Pfaffl, Tichopad, Prgomet, & Neuvians, 2004). Brevemente, BestKeeper evalúa la estabilidad de expresión de cada gen de referencia (GR) mediante la estimación de dos parámetros: la estabilidad a través de la desviación estándar (std. Dev.) y la correlación de sus valores de Cq al índice BestKeeper (coeficiente de correlación de Pearson r y valor de p).

Los GR usados por nosotros: miR-16 y let7-b, muestran que efectivamente su expresión se mantiene estable en las muestras analizadas (std. Dev. <1), con una correlación significativa al índice de BestKeeper ($p < 0.05$), es decir, funcionan como genes de referencia en nuestro estudio (Fig. 12).

Por otro lado, se calculó la eficiencia de amplificación para cada par de cebadores, obteniéndose: $E_{\text{miR-203}}=1.98$; $E_{\text{miR-16}}=1.93$; $E_{\text{let7-b}}=2.08$ (Fig. 13). Las eficiencias se encontraron dentro del rango 90-110%, considerándose aceptables y comparables.

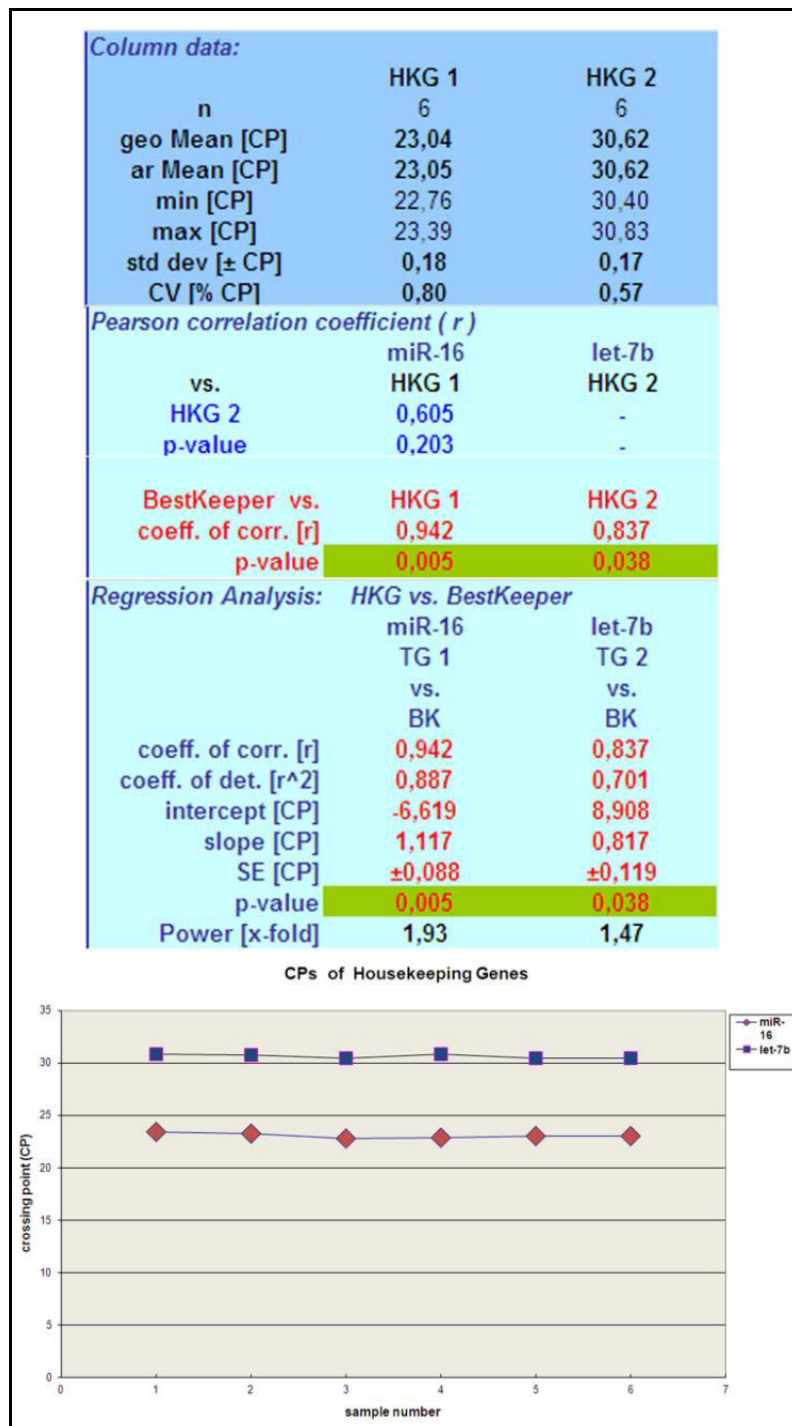


Figura 12: Salida del programa BestKeeper empleado para la evaluación de la estabilidad de la expresión de los genes de referencia a usar. Los genes de referencia usados fueron: miR-16 y let7-b, los cuales funcionan adecuadamente como genes de referencia en nuestro estudio.

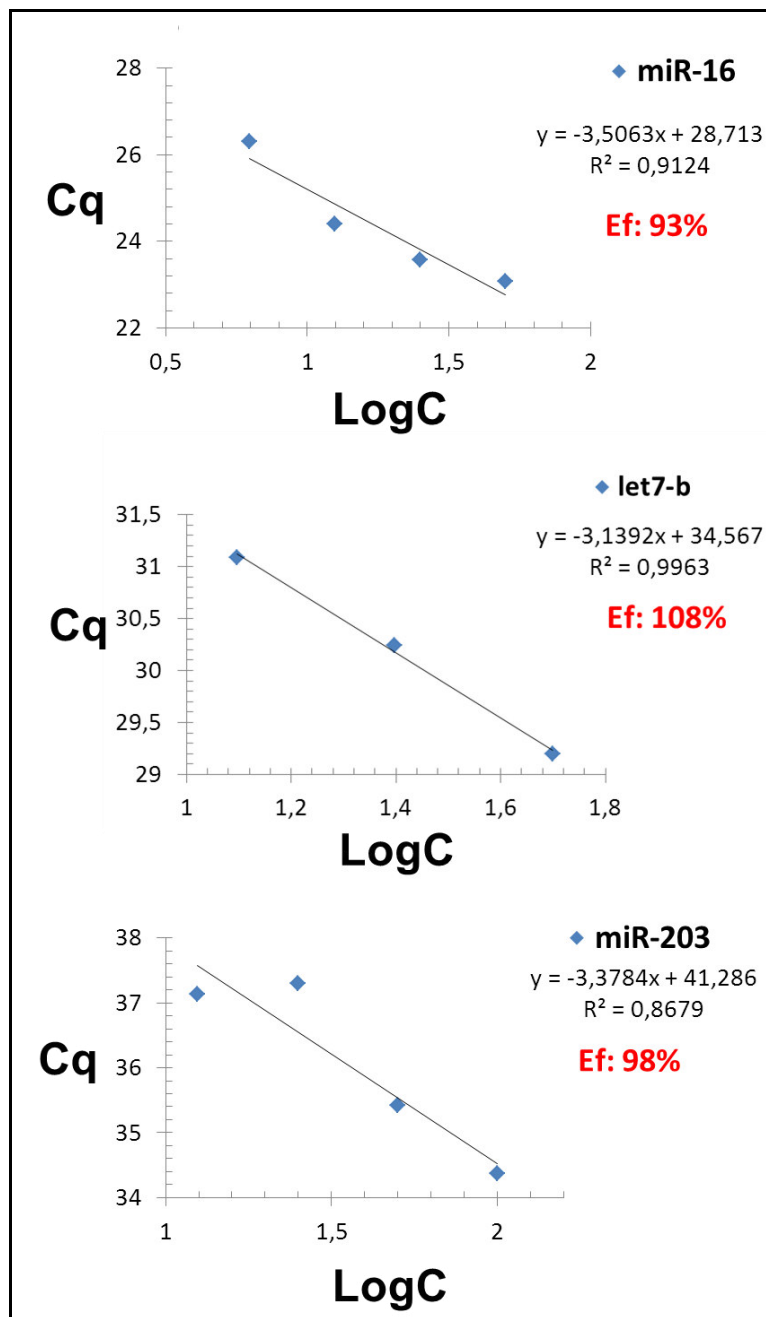


Figura 13: Cálculo de eficiencias de amplificación para cada par de cebadores de los genes analizados. Se muestran las gráficas de los Cq Vs el logaritmo de la concentración (Log C). Las curvas estándares se crearon mediante diluciones seriadas de un mix de ADNc.

Es importante recalcar que la amplificación específica de cada microARN se confirmó al observar un único pico en las curvas de disociación (Fig. 14) y una única banda de tamaño esperado en una electroforesis en gel de agarosa (Fig. 15).

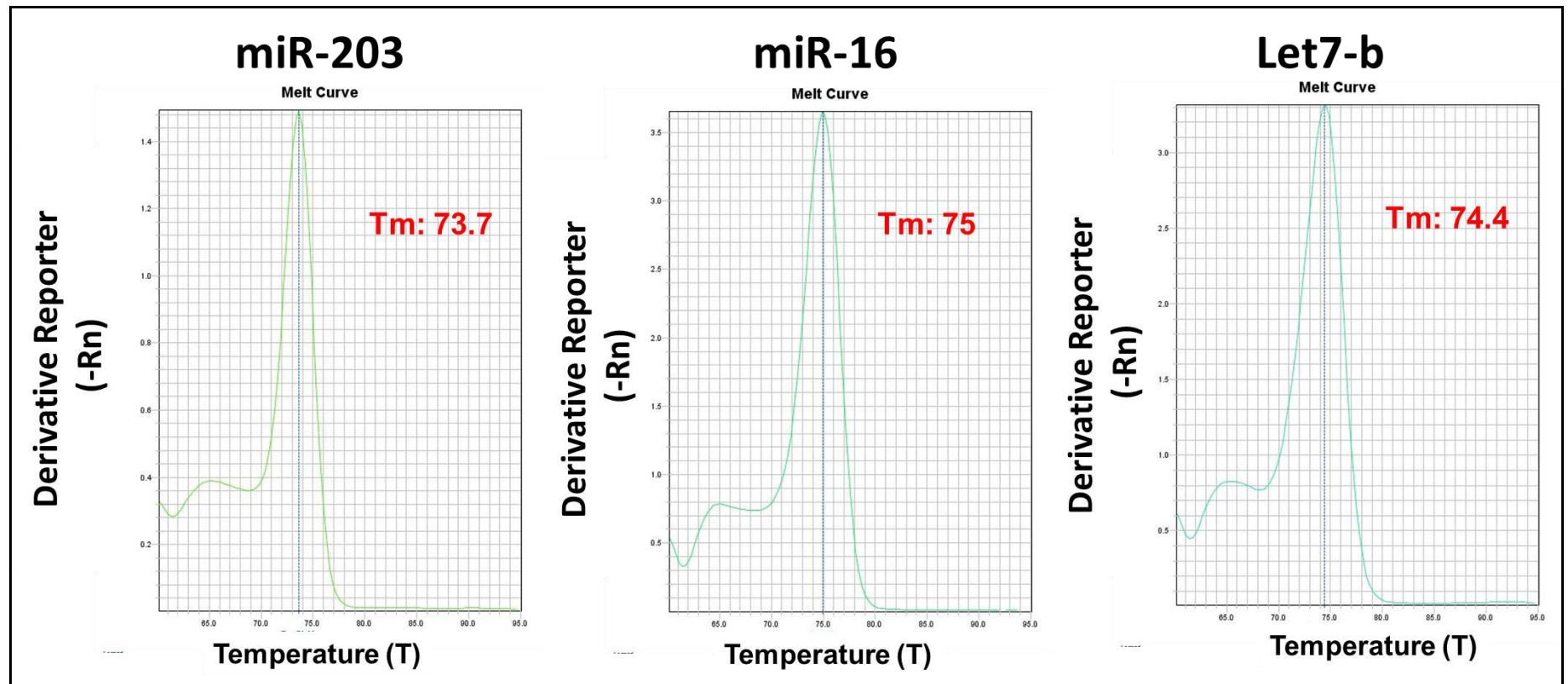


Figura 14: Determinación de la amplificación específica de los cebadores para miR-203, 16 y let7-b mediante el análisis de las curvas de disociación: Fluorescencia (Derivative Reporter (-Rn)) Vs.Temperatura (T).

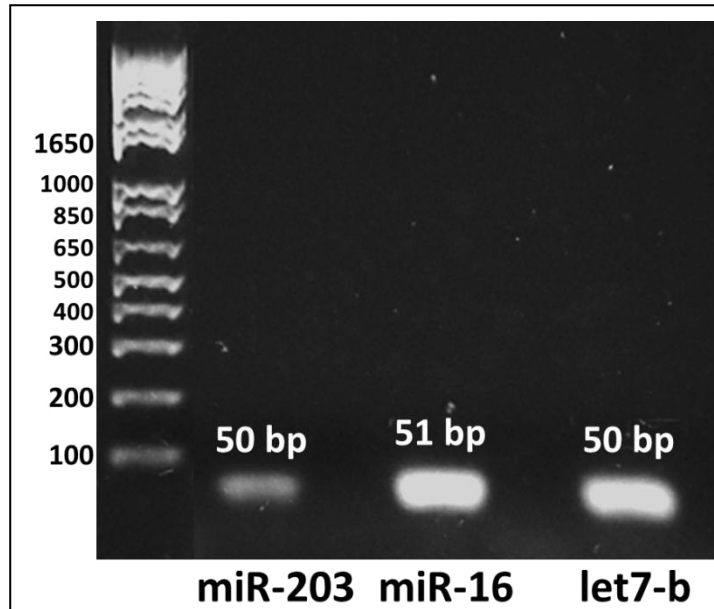


Figura 15: Determinación de la amplificación específica de los cebadores para miR-203, 16 y let7-b mediante la obtención de una única banda del tamaño esperado en una corrida electroforética.

Para la determinación de la expresión de miR-203 a través de estadios y en diferentes momentos del desarrollo de las CCN, se realizó su cuantificación relativa mediante stem Loop RT-qPCR utilizando los genes de referencia (GR) miR-16 y let7-b. Los niveles de expresión de los distintos genes mostraron un amplio rango de valores de Cq, desde 23.44 a 38.63.

Se graficaron los valores RQ obtenidos del análisis de datos de la stem Loop RT-qPCR para cada GR. Para un análisis más preciso se dividió el patrón espacio-temporal de la expresión de miR-203 en dos intervalos. Entre los estadios 5 al 9 en donde se analizaron embriones enteros (Fig. 16 A) y luego comparando tubo neural dorsal (CCN premigratorias) y ventral en estadio 9, conjuntamente con CCN migratorias aisladas a partir de embriones en estadio 11 (Fig. 16 B). Se evidencia que la expresión de miR-203 disminuye en los estadios en los cuales ocurre la TEM y migración, estadio 8-9, y cuando las CCN se encuentran en un estadio premigratorio. Esto nos permite hipotetizar un posible rol durante el inicio de la TEM de las CCN.

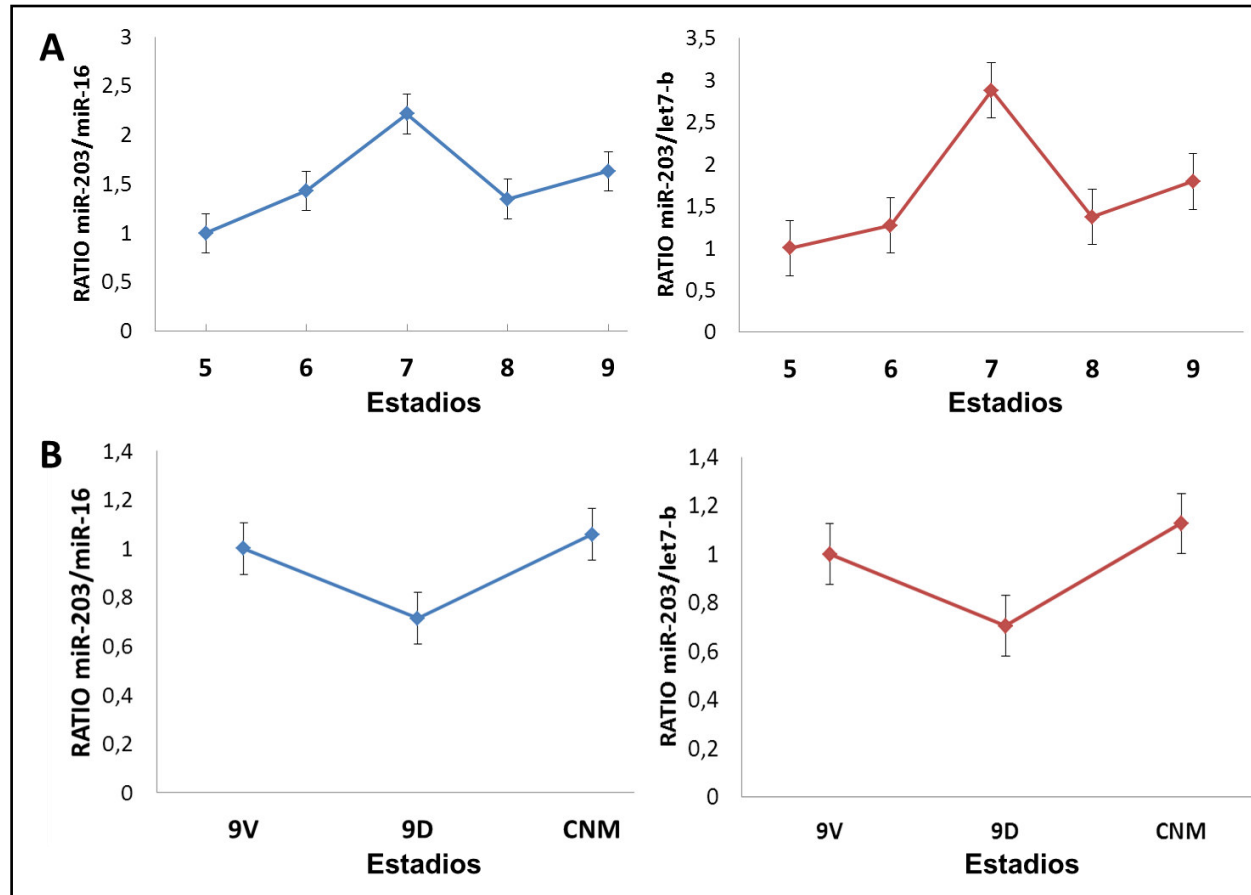


Figura 16: Gráficas de los valores RQ del análisis de datos obtenidos de la stem Loop RT-qPCR. Se muestra el patrón espacio-temporal de la expresión de miR-203 en dos intervalos. A) Entre los estadios 5 al 9 utilizando embriones enteros; y B) comparando tubo neural ventral (estadio 9D) y dorsal (estadio 9V) y CCN migratorias (CNM).

6. 3. Metilación del contexto genómico de miR-203 en el desarrollo normal de la cresta neural

Los resultados anteriores demostraron que la disminución de la expresión de miR-203 concuerda con el inicio de la TEM de las CCN. Por otro lado, considerando que la disminución de la expresión de este microARN en diversos tipos de cánceres ocurre debido a la hipermetilación de su promotor (Chim, Wan, et al., 2011; Chim, Wong, et al., 2011; Furuta et al., 2010; Huang et al., 2014; Moes et al., 2012; Taube et al., 2013; K. Y. Wong et al., 2011; J. Zhang et al., 2013; Z. Zhang et al., 2011), se decidió analizar el estado de metilación de su contexto genómico durante el desarrollo de las CCN.

Para esto se compararon los patrones de metilación de ADN en tubo neural ventral y dorsal (donde se encuentran las CCN premigratorias) en estadio 9, y CCN migratorias (CNM) colectadas en estadio 11. El resultado del análisis de metilación se realizó en las dos regiones próximas al gen gga-miR-203, según lo descrito en la sección “materiales y métodos”, región F1R1 (Fig. 17) y región F3R3 (Fig. 18).

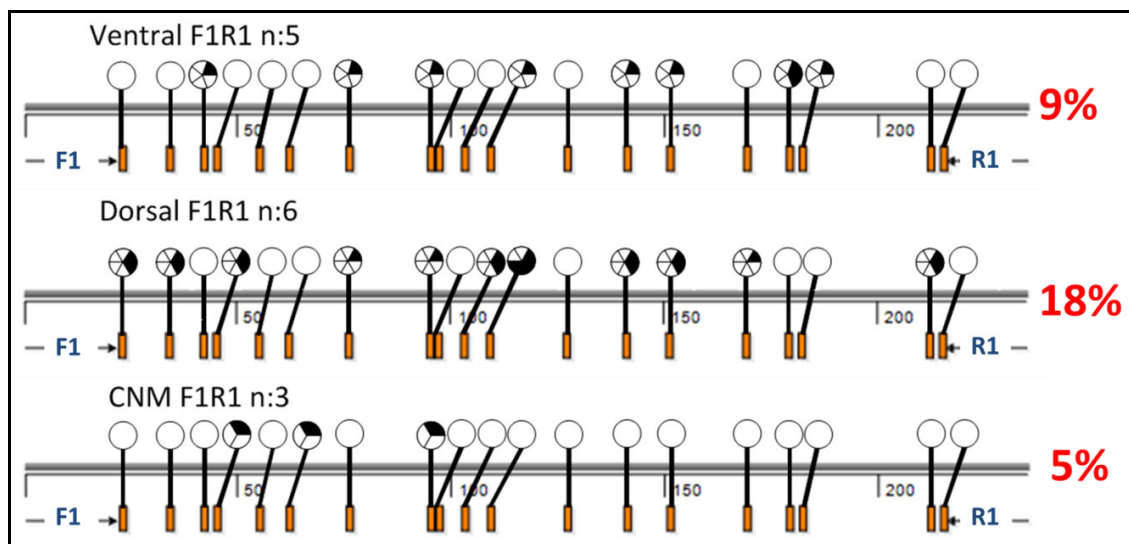


Figura 17: Análisis de metilación alelo-específica la región F1R1. Los gráficos circulares denotan en negro la cantidad de CpG metiladas para cada ubicación. Las muestras analizadas fueron el tubo neural ventral (n=5), el tubo neural dorsal (n=6) y la CNM (n=3). Los números en rojo denotan el porcentaje total de CpG metilados en toda la región F1R1 para todos los clones analizados.

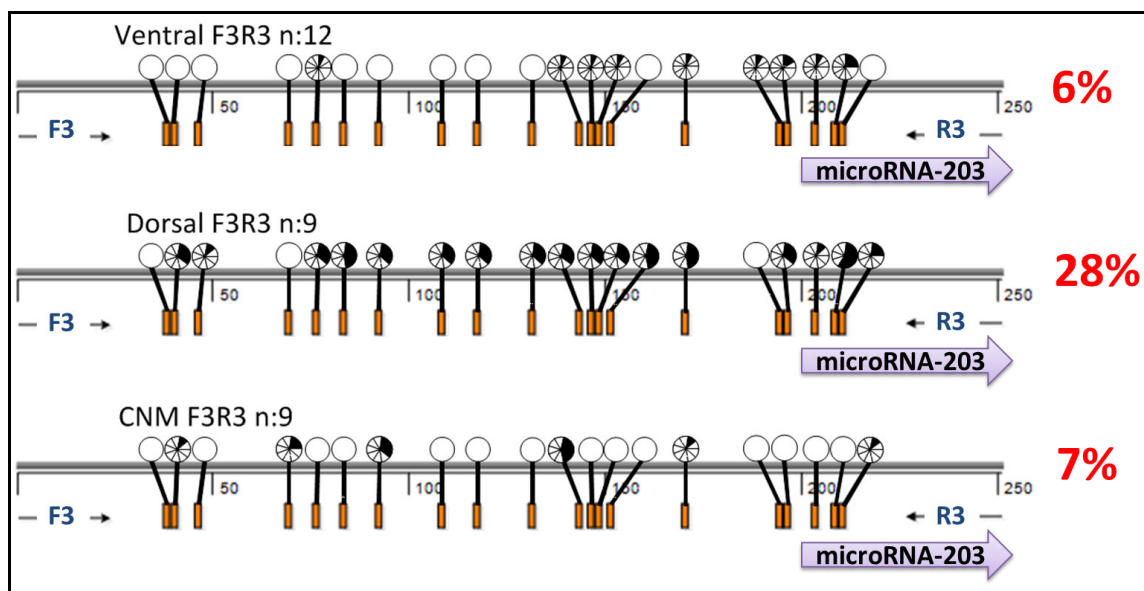


Figura 18: Análisis de metilación alelo-específica de la región F3R3. Los gráficos circulares denotan en negro la cantidad de CpG metiladas para cada ubicación. Las muestras analizadas fueron el tubo neural ventral (n=12), el tubo neural dorsal (n=9) y la CNM (n=9). Los números en rojo denotan el porcentaje total de CpG metilados en toda la región F3R3 para todos los clones analizados.

Es importante recalcar que, en ambas regiones, F1R1 y F3R3, la parte dorsal del tubo neural, correspondiente a las CCN premigratorias, se encuentra hipermetilada. Esta hipermetilación coincide con la disminución en la expresión de miR-203 observada en el experimento anterior y con el momento en que las CCN tienen que iniciar el proceso de TEM.

6. 4. Efecto de la pérdida de función del miR-203 en la migración de las células de la cresta neural

Para cumplir el objetivo de determinar cómo influye el miR-203 en la migración de las CCN, se procedió a realizar experimentos de pérdida de función mediante el uso de un vector “esponja” diseñado en el laboratorio, pSmir-203. Por otro lado, como control de la electroporación, se utilizó un vector “esponja” de microARNs que tiene la secuencia de miR-203 al azar, pScramble-miR-203.

Ambos vectores, pSmir-203 y pScramble-miR-203 se electroporaron unilateralmente en embriones de pollo en estadio 4, y se analizó la capacidad

migratoria de las CCN mediante IHQ contra Snail2 cuando los mismos tenían 6-7 somitas (Fig. 19).

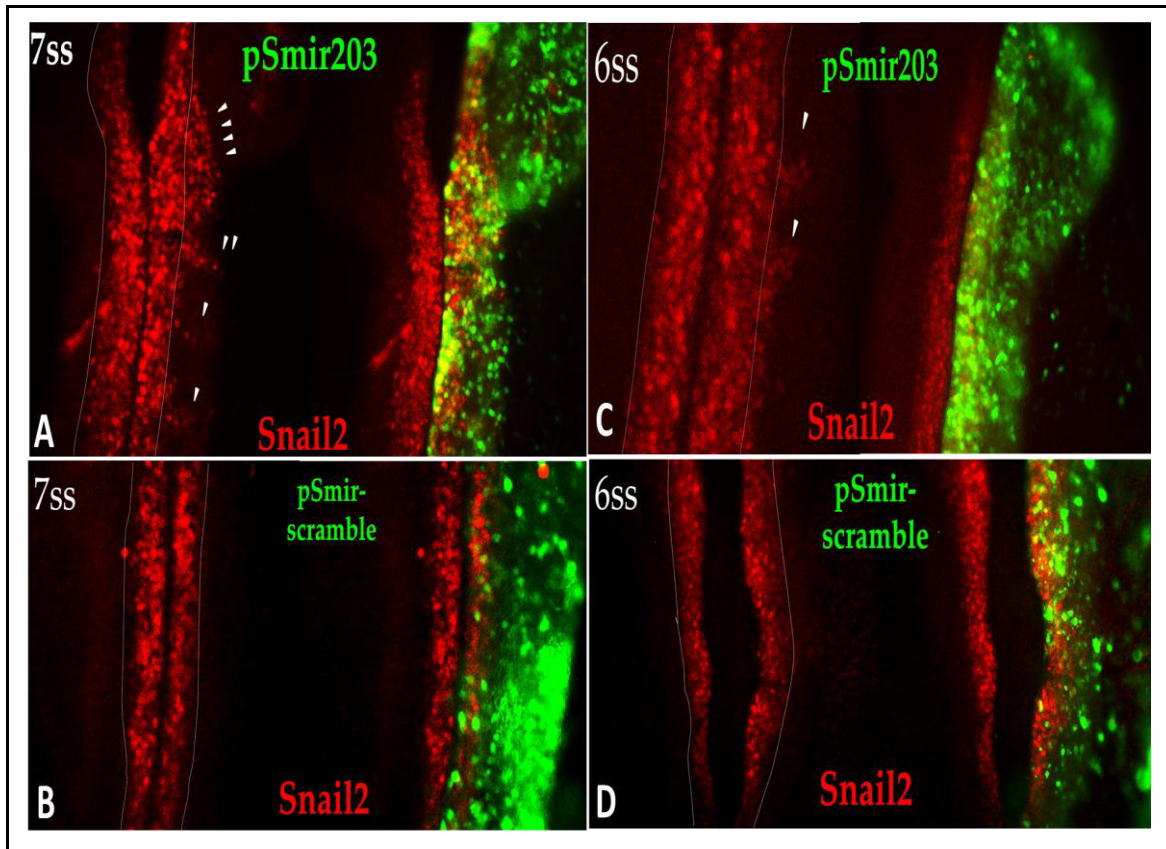


Figura 19: Inmunohistoquímica contra Snail2 de embriones electroporados con los vectores pSmir-203 y pScramble-miR-203.

Todos los embriones están electroporados en el lado derecho. A) - B) Embriones de 7 somitas (ss) electroporado con pSmir-203 y pScramble-miR-203, respectivamente. C) - D) Embriones de 6ss electroporado con pSmir-203 y pScramble-miR-203, respectivamente. Las flechas blancas marcan las CCN migrando prematuramente.

Nuestros resultados muestran que la pérdida de función del miR-203 endógeno, lleva a una migración prematura de las CCN, comparado con el lado no electroporado o embriones electroporados con el vector scramble, donde aún no ha comenzado la migración. Esto nos indica que el miR-203 jugaría un rol preponderante en el inicio de la TEM de las CCN.

7.DISCUSIÓN

Diversas investigaciones en los últimos años han demostrado la importancia de los microARNs durante el desarrollo animal (Alvarez-Garcia & Miska, 2005; Kloosterman & Plasterk, 2006), llegando a las siguientes conclusiones: 1) los animales no pueden sobrevivir sin microARNs, 2) existe un gran repertorio de microARNs conservados en la evolución de los metazoos, 3) la mayoría de los ARNm posee sitios conservados para microARNs, 4) la mayoría de los microARNs se expresa de forma tejido-específica, 5) el rol de los microARNs en algunas enfermedades se encuentra bien establecido.

Sin embargo, si bien se conocen las funciones específicas de determinados microARNs durante el desarrollo animal, la forma en que ocurre su regulación tejido-específica durante las diferentes etapas del desarrollo, es un campo en el cual aún existen muchas cosas que descubrir. En este contexto, se ha determinado que la Epigenética está implicada en esta expresión espacio-temporal y dirige importantes procesos durante el desarrollo normal y patológico (Kloosterman & Plasterk, 2006). Este nivel de control denominado regulación epigenética-microARN regula la expresión de microARNs mediante vías epigenéticas para determinar la sincronía adecuada de los procesos que rigen el desarrollo del embrión (Wiklund et al., 2010).

7. 1. Los principales genes que regulan la TEM en las CCN son putativos blancos del miR-203

Nuestro análisis *in silico* inicial evidenció que el mismo microARN, denominado gga-miR-203, posee como blancos tentativos a los genes Snail2 y PHD12 (Fig. 8-9). Esta tesis es el primer reporte en el cual se propone al ARNm de la proteína PHD12 como blanco tentativo del miR-203. Es importante recalcar que, junto a Snail2, PHD12 forma parte de un complejo represor de la expresión de Cad6b, importante para el inicio de la TEM en las CCN (Strobl-Mazzulla & Bronner, 2012b).

Por otro lado, Snail2 es un blanco confirmado del miR-203 (X. Ding, Park, McCauley, & Wang, 2013; Qu et al., 2013; Z. Zhang et al., 2011). De forma general, para que las células tumorales sean sometidas a la TEM, inicialmente miR-203 debe ser silenciado mediante hipermetilación de su promotor. Este silenciamiento de miR-203 produce que su gen blanco Snail2 aumente su expresión, lo que causa la inhibición de la expresión de la Cad-E, proceso fundamental para dar inicio a la TEM tumoral. Esta inactivación epigenética del miR-203 ha sido demostrada en diversos tipos de cánceres, incluyendo: carcinoma hepatocelular (Furuta et al., 2010), cáncer de próstata (Viticchiè et al., 2011), cáncer de vejiga y riñones (Gottardo et al., 2007), cáncer de ovario (Iorio et al., 2007), cáncer de páncreas (Greither et al., 2010), cáncer de colon (Schetter et al., 2008), cáncer de esófago (Feber et al., 2008), leucemias (Bueno et al., 2008) y cáncer de mama (Z. Zhang et al., 2011). Considerando su función en el cáncer, miR-203 es considerado un supresor de tumores (Furuta et al., 2010) al regular, no solo la TEM, sino también la adquisición de totipotencialidad de las células madres del cáncer (DeCastro et al., 2013; Ju, Chiou, & Su, 2014; Lena et al., 2008).

Además, se determinó también que miR-203 está conservado en diversos metazoos (Fig. 10) con una identidad del 99% en su secuencia y con un 100% de identidad en la región “semilla”, importante para el reconocimiento de sus blancos. Es importante recalcar que el análisis de miR-203 incluyó a la especie *Petromyzon marinus*, lamprea, representante vivo de los vertebrados más antiguo que existe y el cual, actualmente, está siendo bastante utilizado para determinar los mecanismos regulatorios conservados durante la evolución de la CN (Medeiros, 2013; Sauka-Spengler & Bronner-Fraser, 2008b). Estos resultados nos dan indicios de que esta red de regulación, la cual involucra al miR-203, Snail2 y PHD12 podría ser un mecanismo conservado durante el desarrollo normal de las CCN y sería muy interesante validar esta afirmación en diversos modelos experimentales tales como pez cebra y ratón.

7. 2. miR-203 se expresa de manera coincidente con su posible rol en la regulación de la TEM de las CCN

Investigaciones recientes muestran que la expresión espacio-temporal de los microARNs es tejido-específica durante el desarrollo normal (Aboobaker, Tomancak, Patel, Rubin, & Lai, 2005; Ason et al., 2006; Wienholds et al., 2005). Lo que indica que los microARNs están involucrados en la especificación y mantenimiento de la identidad de los tejidos (Kloosterman & Plasterk, 2006). Nuestros resultados del patrón de expresión espacio-temporal demuestran que miR-203 se expresa tempranamente en el desarrollo aviar, y luego disminuye su expresión, coincidentemente con el momento en donde se activa la expresión de sus genes blanco y las CCN comienzan su migración (Fig. 11). Los resultados de la HIS fueron corroborados mediante stem loop qRT-PCR, denotando que miR-203 se expresa desde el estadio 5, alcanzando su pico máximo de expresión en el estadio 7, y disminuyendo su expresión en el estadio 8 y 9 (Fig. 16 A). Particularmente, también se pudo detectar que la expresión de miR-203 fue menor en el tubo neural dorsal, CCN premigratorias, comparado con la expresión en las CCN migratorias y las del tubo neural ventral, parte del sistema nervioso central (Fig. 16 B). Es interesante que el patrón de expresión observado es contrario al de sus potenciales genes blancos Snail2 y PHD12, los cuales se caracterizan por mostrar un incremento en su expresión a partir del estadio 8 y alcanzar sus niveles máximos en el estadio 9, en donde reprimen a la Cad6b para dar inicio a la TEM de las CCN (Strobl-Mazzulla & Bronner, 2012b; Taneyhill et al., 2007).

Por otra parte, el restablecimiento de la expresión del miR-203 en las CCN migratorias (Fig. 16 B) puede aludir a que estas deberán luego iniciar el proceso inverso de transición mesénquima-epitelio (TME), para diferenciarse y formar diversos tejidos. Este tipo de regulación también es evidente en el establecimiento de tumores secundarios luego de la metástasis (DeCastro et al., 2013; Ju et al., 2014; Lena et al., 2008), mostrando nuevamente posibles similitudes entre ambos procesos. Además, así como ha sido descrito que la expresión de miR-203 queda completamente reprimida durante la TEM, previo

a la migración de las células madre cancerígenas, también ha sido descrito que su re-expresión induce TME, previo a la invasión de un nuevo nicho por las mismas (Qu et al., 2013). Sin embargo, para llegar a concluir una función de miR-203 en la TME de las CCN se necesitan realizar más experimentos que escapen del alcance de esta tesis.

7.3. La metilación del ADN regula la represión de miR-203 en las CCN premigratorias.

La metilación de islas CpG asociadas a microARNs es un mecanismo esencial de regulación de este tipo de ARN de cadena simple (Lujambio et al., 2008). A diferencia de lo observado en diversos tipos de células cancerosas, la mayoría de las islas CpG ubicadas en el genoma se encuentran no metiladas (Esteller, 2007). Sin embargo, la metilación en islas CpG durante el desarrollo normal, es un proceso altamente regulado, y otorga características específicas a distintos linajes celulares. Este es el caso de la metilación de promotores de ciertos microARNs, para establecer la identidad tisular de las células en diferenciación (Futscher et al., 2002). Particularmente, al silenciar la expresión de determinados microARNs se permite la expresión de genes blancos que proporcionan características tejido-específicas a estas células.

Considerando los resultados obtenidos en el cual la expresión de miR-203 se ve disminuida en las CCN pre-migratorias, se buscó determinar si esta inhibición resulta de la metilación diferencial de sus regiones regulatorias, como ya se reportó en diversos tipos de cánceres (Chim, Wong, et al., 2011; Furuta et al., 2010; Taube et al., 2013; Z. Zhang et al., 2011). Es así que, mediante secuenciación por bisulfito, se demostró que la región genómica de miR-203 se encuentra hipermetilada en las CCN pre-migratorias, tubo neural dorsal, a diferencia de la hipometilación encontrada en las células del tubo neural ventral y en la CNM (Figs. 17-18). Con una mayor proporción de metilación en la región F3R3 (Fig. 18) que en la región F1R1 (Fig. 17), probablemente porque es la región F3R3, más próxima al stem loop del miR-203, la que contiene al promotor. Estos resultados comparados con la expresión de miR-203 indican

que su inhibición, previa a la migración de las CCN, está regulada epigenéticamente mediante metilación del ADN.

Es importante resaltar que ambas metiltransferasas de ADN *de novo*: DNMT3A y DNMT3B, tienen un rol fundamental durante el desarrollo de las CCN (Hu et al., 2012; Hu, Strobl-Mazzulla, Simoes-Costa, Sanchez-Vasquez, & Bronner, 2014). Se ha descrito que la DNMT3B está involucrada en la represión del gen Sox10 para determinar el momento específico en el cual las CCN dejan de producirse (Hu et al., 2014). A su vez, la DNMT3A promueve la especificación de las CCN al mediar directamente la represión de los genes neuronales como Sox2 y Sox3. (Hu et al., 2012). Considerando esto, es fundamental establecer cuál de las DNMTs está involucrada en la hipermetilación del miR-203 observada en las CCN premigratorias.

7. 4. La pérdida de función de miR-203 lleva a una migración prematura de las CCN

Respecto al análisis de pérdida de función del miR-203, la evaluación de la parte de los embriones transfectados con el plásmido pSmiR-203, respecto a la parte no transfectada o transfectada con el plásmido control (Fig. 19) muestra que miR-203 estaría involucrado en la migración de las CCN.

Por otro lado, queda determinar a futuro si Snail2 y PHD12 son realmente blancos directos de este microARN. Si bien aún estamos en etapas preliminares, este es el primer estudio que indica la presencia de una red regulatoria epigenética-miARN-genes blanco en un modelo *in vivo* y en un evento del desarrollo tan importante como es la migración de las CCN.

Todos los resultados obtenidos indicaron que existe una red epigenética-miARN íntimamente ligada a la regulación espacio-temporal de la migración de las CCN. En este contexto, se hipotetizó un modelo de regulación epigenético-microARN necesario para el normal desarrollo de la TEM de las CCN (Fig. 20). Básicamente, el miR-203 prevendría la migración prematura de las CCN hasta que este es epigenéticamente silenciado mediante metilación de sus regiones regulatorias, por alguna DNMT *de novo*. Esta represión llevaría a un aumento

en la expresión de sus genes blanco, PHD12 y Snail2, los cuales son requeridos para formar un complejo represor que inhibe la expresión de la Cad6b, necesario para que las CCN pierdan sus características epiteliales y comiencen su transición a convertirse en células mesenquimáticas migratorias (Strobl-Mazzulla & Bronner, 2012b).

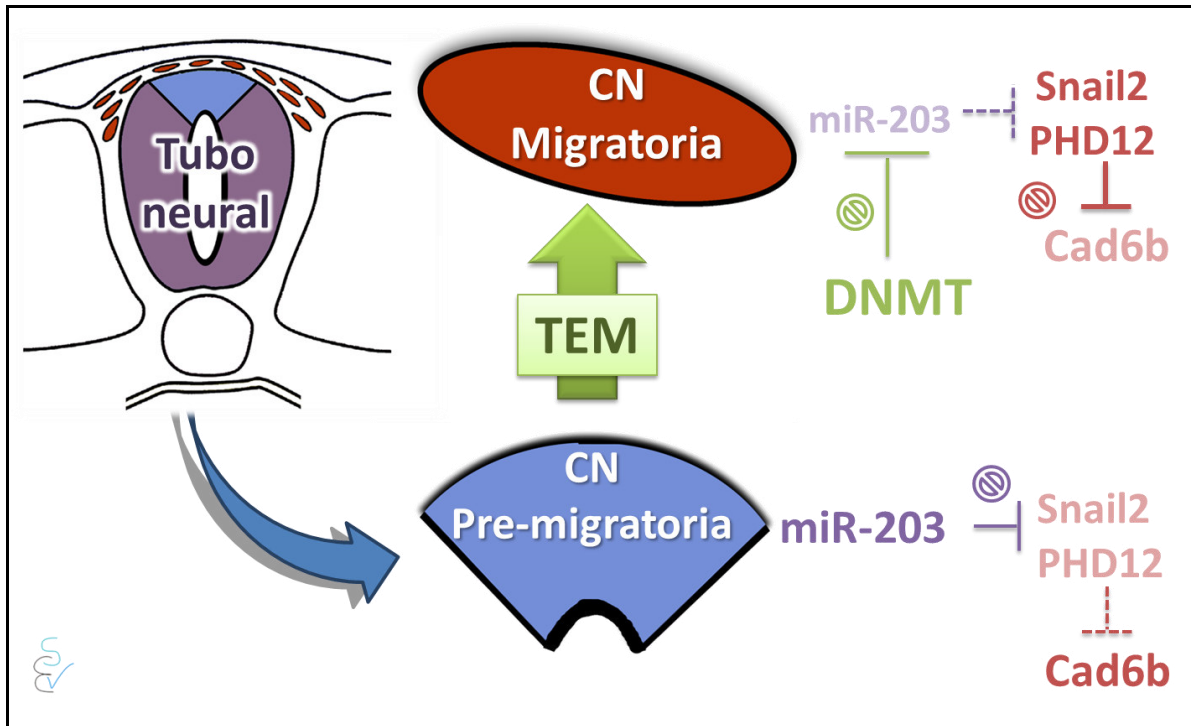


Figura 20: Modelo hipotético de regulación epigenética-microARN entre alguna ADN metiltransferasa (DNMT), el miR-203 y sus blancos Snail2 y PHD12; los símbolos ⊥ indican inhibición.

8.CONCLUSIONES

- Se determinó que reguladores claves de la TEM, los genes PHD12 y Snail2, son blancos del mismo microARN, miR-203.
- Se determinó que la expresión de miR-203 inicia en el estadio 4 y continúa específicamente en la zona del desarrollo del tubo neural en estadio 8. Además se observó que a partir del estadio de CN premigratorio, su expresión se ve disminuida.
- Se determinó que la región genómica de miR-203 se encuentra hipometilada en las CCN pre-migratorias, a diferencia de la hipometilación encontrada en las células del tubo neural ventral y CCN migratorias.
- Se observó migración prematura de las CCN durante la pérdida de función de miR-203 por “esponjas” de microARNs.
- Se planteó un modelo hipotético de regulación epigenética-microARN ligado a la regulación espacio-temporal de la migración de las CCN. En este modelo participa alguna ADN metiltransferasa (DNMT), el miR-203 y sus blancos Snail2 y PHD12.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboobaker, A. A., Tomancak, P., Patel, N., Rubin, G. M., & Lai, E. C. (2005). *Drosophila* microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(50), 18017-18022. doi: 10.1073/pnas.0508823102
- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*, 119(6), 1438-1449. doi: 10.1172/JCI38019
- Acloque, H., Ocana, O. H., Matheu, A., Rizzoti, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., & Nieto, M. A. (2011). Reciprocal repression between Sox3 and snail transcription factors defines embryonic territories at gastrulation. *Dev Cell*, 21(3), 546-558. doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.005
- Ahmad, A., Li, Y., Bao, B., Kong, D., & Sarkar, F. H. (2014). Epigenetic regulation of miRNA-cancer stem cells nexus by nutraceuticals. *Mol Nutr Food Res*, 58(1), 79-86. doi: 10.1002/mnfr.201300528
- Alvarez-Garcia, I., & Miska, E. A. (2005). MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 132(21), 4653-4662. doi: 10.1242/dev.02073
- Ambros, V. (2001). microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, 107(7), 823-826.
- Ason, B., Darnell, D. K., Wittbrodt, B., Berezikov, E., Kloosterman, W. P., Wittbrodt, J., . . . Plasterk, R. H. (2006). Differences in vertebrate microRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(39), 14385-14389. doi: 10.1073/pnas.0603529103
- Baker, C. V., & Bronner-Fraser, M. (1997). The origins of the neural crest. Part II: an evolutionary perspective. *Mech Dev*, 69(1-2), 13-29.

- Basch, M. L., Garcia-Castro, M. I., & Bronner-Fraser, M. (2004). Molecular mechanisms of neural crest induction. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 72(2), 109-123. doi: 10.1002/bdrc.20015
- Bonnomet, A., Brysse, A., Tachsidis, A., Waltham, M., Thompson, E. W., Polette, M., & Gilles, C. (2010). Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15(2), 261-273. doi: 10.1007/s10911-010-9174-0
- Bronner, M. E. (2012). Formation and migration of neural crest cells in the vertebrate embryo. *Histochem Cell Biol*, 138(2), 179-186. doi: 10.1007/s00418-012-0999-z
- Bueno, M. J., Perez de Castro, I., Gomez de Cedron, M., Santos, J., Calin, G. A., Cigudosa, J. C., . . . Malumbres, M. (2008). Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell*, 13(6), 496-506. doi: 10.1016/j.ccr.2008.04.018
- Cunningham, F., Amode, M. R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., . . . Flicek, P. (2014). Ensembl 2015. *Nucleic Acids Res*. doi: 10.1093/nar/gku1010
- Curwen, V., Eyra, E., Andrews, T. D., Clarke, L., Mongin, E., Searle, S. M., & Clamp, M. (2004). The Ensembl automatic gene annotation system. *Genome Res*, 14(5), 942-950. doi: 10.1101/gr.1858004
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., . . . Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 33(20), e179. doi: 10.1093/nar/gni178
- Chim, C. S., Wan, T. S., Wong, K. Y., Fung, T. K., Drexler, H. G., & Wong, K. F. (2011). Methylation of miR-34a, miR-34b/c, miR-124-1 and miR-203 in Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *J Transl Med*, 9, 197. doi: 10.1186/1479-5876-9-197

- Chim, C. S., Wong, K. Y., Leung, C. Y., Chung, L. P., Hui, P. K., Chan, S. Y., & Yu, L. (2011). Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies. *J Cell Mol Med*, 15(12), 2760-2767. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01274.x
- Darnell, D. K., Kaur, S., Stanislaw, S., Konieczka, J. H., Yatskievych, T. A., & Antin, P. B. (2006). MicroRNA expression during chick embryo development. *Dev Dyn*, 235(11), 3156-3165. doi: 10.1002/dvdy.20956
- DeCastro, A. J., Dunphy, K. A., Hutchinson, J., Balboni, A. L., Cherukuri, P., Jerry, D. J., & DiRenzo, J. (2013). MiR203 mediates subversion of stem cell properties during mammary epithelial differentiation via repression of Δ NP63 α and promotes mesenchymal-to-epithelial transition. *Cell Death and Disease*, 4(2), e514. doi: 10.1038/cddis.2013.37
- Diaz-Lopez, A., Moreno-Bueno, G., & Cano, A. (2014). Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. *Cancer Manag Res*, 6, 205-216. doi: 10.2147/CMAR.S38156
- Ding, X., Park, S. I., McCauley, L. K., & Wang, C. Y. (2013). Signaling between transforming growth factor beta (TGF-beta) and transcription factor SNAI2 represses expression of microRNA miR-203 to promote epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis. *J Biol Chem*, 288(15), 10241-10253. doi: 10.1074/jbc.M112.443655
- Ding, X. M. (2014). MicroRNAs: regulators of cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Chin J Cancer*, 33(3), 140-147. doi: 10.5732/cjc.013.10094
- Ebert, M. S., & Sharp, P. A. (2010). Emerging roles for natural microRNA sponges. *Curr Biol*, 20(19), R858-861. doi: 10.1016/j.cub.2010.08.052
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*, 8(4), 286-298. doi: 10.1038/nrg2005

- Feber, A., Xi, L., Luketich, J. D., Pennathur, A., Landreneau, R. J., Wu, M., . . . Litle, V. R. (2008). MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 135(2), 255-260; discussion 260. doi: 10.1016/j.jtcvs.2007.08.055
- Foubert, E., De Craene, B., & Berx, G. (2010). Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. The Snail1-Twist1 conspiracy in malignant breast cancer progression. *Breast Cancer Res*, 12(3), 206. doi: 10.1186/bcr2585
- Furuta, M., Kozaki, K. I., Tanaka, S., Arii, S., Imoto, I., & Inazawa, J. (2010). miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 31(5), 766-776. doi: 10.1093/carcin/bgp250
- Futscher, B. W., Oshiro, M. M., Wozniak, R. J., Holtan, N., Hanigan, C. L., Duan, H., & Domann, F. E. (2002). Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet*, 31(2), 175-179. doi: 10.1038/ng886
- Glazov, E. A., Cottee, P. A., Barris, W. C., Moore, R. J., Dalrymple, B. P., & Tizard, M. L. (2008). A microRNA catalog of the developing chicken embryo identified by a deep sequencing approach. *Genome Res*, 18(6), 957-964. doi: 10.1101/gr.074740.107
- Gottardo, F., Liu, C. G., Ferracin, M., Calin, G. A., Fassan, M., Bassi, P., . . . Baffa, R. (2007). Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol*, 25(5), 387-392. doi: 10.1016/j.urolonc.2007.01.019
- Greither, T., Grochola, L. F., Udelnow, A., Lautenschlager, C., Wurl, P., & Taubert, H. (2010). Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer*, 126(1), 73-80. doi: 10.1002/ijc.24687
- Griffiths-Jones, S. (2006). miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol*, 342, 129-138. doi: 10.1385/1-59745-123-1:129

- Griffiths-Jones, S. (2010). miRBase: microRNA sequences and annotation. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 12, Unit 12 19 11-10. doi: 10.1002/0471250953.bi1209s29
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S., & Enright, A. J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 36(Database issue), D154-158. doi: 10.1093/nar/gkm952
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(8), 509-524. doi: 10.1038/nrm3838
- Hall, B. K. (2008). The neural crest and neural crest cells: discovery and significance for theories of embryonic organization. *J Biosci*, 33(5), 781-793.
- Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*, 88(1), 49-92.
- Harris, M. L., Baxter, L. L., Loftus, S. K., & Pavan, W. J. (2010). Sox proteins in melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 23(4), 496-513. doi: 10.1111/j.1755-148X.2010.00711.x
- Hu, N., Strobl-Mazzulla, P., Sauka-Spengler, T., & Bronner, M. E. (2012). DNA methyltransferase3A as a molecular switch mediating the neural tube-to-neural crest fate transition. *Genes Dev*, 26(21), 2380-2385. doi: 10.1101/gad.198747.112
- Hu, N., Strobl-Mazzulla, P. H., Simoes-Costa, M., Sanchez-Vasquez, E., & Bronner, M. E. (2014). DNA methyltransferase 3B regulates duration of neural crest production via repression of Sox10. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(50), 17911-17916. doi: 10.1073/pnas.1318408111
- Huang, Y. W., Kuo, C. T., Chen, J. H., Goodfellow, P. J., Huang, T. H., Rader, J. S., & Uyar, D. S. (2014). Hypermethylation of miR-203 in endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol*, 133(2), 340-345. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.02.009

- Hubbard, T., Barker, D., Birney, E., Cameron, G., Chen, Y., Clark, L., . . . Clamp, M. (2002). The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Res*, 30(1), 38-41.
- Iorio, M. V., Visone, R., Di Leva, G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., . . . Croce, C. M. (2007). MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res*, 67(18), 8699-8707. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1936
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 33 Suppl, 245-254. doi: 10.1038/ng1089
- Ju, S. Y., Chiou, S. H., & Su, Y. (2014). Maintenance of the stemness in CD44(+) HCT-15 and HCT-116 human colon cancer cells requires miR-203 suppression. *Stem Cell Res*, 12(1), 86-100. doi: 10.1016/j.scr.2013.09.011
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119(6), 1420-1428. doi: 10.1172/JCI39104
- Kerosuo, L., & Bronner-Fraser, M. (2012). What is bad in cancer is good in the embryo: importance of EMT in neural crest development. *Semin Cell Dev Biol*, 23(3), 320-332. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.03.010
- Kiefer, J. C. (2007). Epigenetics in development. *Dev Dyn*, 236(4), 1144-1156. doi: 10.1002/dvdy.21094
- Kiesslich, T., Pichler, M., & Neureiter, D. (2013). Epigenetic control of epithelial-mesenchymal-transition in human cancer. *Mol Clin Oncol*, 1(1), 3-11. doi: 10.3892/mco.2012.28
- Kim, H., Kang, T., & Kim, J. (2013). Environmental effects on the epigenetics of neural crest cell development. *OA Molecular & Cell Biology*, 01.

- Kloosterman, W. P., & Plasterk, R. H. (2006). The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*, 11(4), 441-450. doi: 10.1016/j.devcel.2006.09.009
- Kluiser, J., Gibcus, J. H., Hettinga, C., Adema, A., Richter, M. K., Halsema, N., . . . van den Berg, A. (2012). Rapid generation of microRNA sponges for microRNA inhibition. *PLoS One*, 7(1), e29275. doi: 10.1371/journal.pone.0029275
- Lande-Diner, L., Zhang, J., Ben-Porath, I., Amariglio, N., Keshet, I., Hecht, M., . . . Cedar, H. (2007). Role of DNA methylation in stable gene repression. *J Biol Chem*, 282(16), 12194-12200. doi: 10.1074/jbc.M607838200
- Lardizabal, M. N., Nocito, A. L., Daniele, S. M., Ornella, L. A., Palatnik, J. F., & Veggi, L. M. (2012). Reference genes for real-time PCR quantification of microRNAs and messenger RNAs in rat models of hepatotoxicity. *PLoS One*, 7(5), e36323. doi: 10.1371/journal.pone.0036323
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., . . . Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415-419. doi: 10.1038/nature01957
- Lena, A. M., Shalom-Feuerstein, R., Rivetti di Val Cervo, P., Aberdam, D., Knight, R. A., Melino, G., & Candi, E. (2008). miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ*, 15(7), 1187-1195. doi: 10.1038/cdd.2008.69
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1), 15-20. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.035
- Lin, T., Ponn, A., Hu, X., Law, B. K., & Lu, J. (2010). Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snai1-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*, 29(35), 4896-4904. doi: 10.1038/onc.2010.234

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lujambio, A., Calin, G. A., Villanueva, A., Ropero, S., Sanchez-Cespedes, M., Blanco, D., . . . Esteller, M. (2008). A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(36), 13556-13561. doi: 10.1073/pnas.0803055105
- Mayor, R., & Carmona-Fontaine, C. (2010). Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends Cell Biol*, 20(6), 319-328. doi: 10.1016/j.tcb.2010.03.005
- Medeiros, D. M. (2013). The evolution of the neural crest: new perspectives from lamprey and invertebrate neural crest-like cells. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2(1), 1-15. doi: 10.1002/wdev.85
- Meng, F., & Wu, G. (2012). The rejuvenated scenario of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 31(3-4), 455-467. doi: 10.1007/s10555-012-9379-3
- Milet, C., & Monsoro-Burq, A. H. (2012). Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Dev Biol*, 366(1), 22-33. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.01.013
- Moes, M., Le Behec, A., Crespo, I., Laurini, C., Halavatyi, A., Vetter, G., . . . Friederich, E. (2012). A novel network integrating a miRNA-203/SNAI1 feedback loop which regulates epithelial to mesenchymal transition. *PLoS One*, 7(4), e35440. doi: 10.1371/journal.pone.0035440
- Moreno-Bueno, G., Portillo, F., & Cano, A. (2008). Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene*, 27(55), 6958-6969. doi: 10.1038/onc.2008.346
- Nakamura, T. (1995). Genetic markers and animal models of neurocristopathy. *Histol Histopathol*, 10(3), 747-759.

- Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*, 1(3), 1559-1582. doi: 10.1038/nprot.2006.236
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247-257.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, 26(6), 509-515.
- Poletta, F. A., Castilla, E. E., Orioli, I. M., & Lopez-Camelo, J. S. (2007). Regional analysis on the occurrence of oral clefts in South America. *Am J Med Genet A*, 143A(24), 3216-3227. doi: 10.1002/ajmg.a.32076
- Qu, Y., Li, W. C., Hellem, M. R., Rostad, K., Popa, M., McCormack, E., . . . Ke, X. S. (2013). MiR-182 and miR-203 induce mesenchymal to epithelial transition and self-sufficiency of growth signals via repressing SNAI2 in prostate cells. *Int J Cancer*, 133(3), 544-555. doi: 10.1002/ijc.28056
- Rasmussen, T. P. (2014). The epigenetics of early development: inferences from stem cells. *Mol Reprod Dev*, 81(2), 194-201. doi: 10.1002/mrd.22269
- Sauka-Spengler, T., & Bronner-Fraser, M. (2008a). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(7), 557-568. doi: 10.1038/nrm2428
- Sauka-Spengler, T., & Bronner-Fraser, M. (2008b). Insights from a sea lamprey into the evolution of neural crest gene regulatory network. *Biol Bull*, 214(3), 303-314.

- Sauka-Spengler, T., & Barembaum, M. (2008). Chapter 12 Gain- and Loss-of-Function Approaches in the Chick Embryo. 87, 237-256. doi: 10.1016/s0091-679x(08)00212-4
- Schetter, A. J., Leung, S. Y., Sohn, J. J., Zanetti, K. A., Bowman, E. D., Yanaihara, N., . . . Harris, C. C. (2008). MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*, 299(4), 425-436. doi: 10.1001/jama.299.4.425
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3(6), 1101-1108.
- Siegfried, Z., Eden, S., Mendelsohn, M., Feng, X., Tsuberi, B. Z., & Cedar, H. (1999). DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet*, 22(2), 203-206. doi: 10.1038/9727
- Strobl-Mazzulla, P. H., & Bronner, M. E. (2012a). Epithelial to mesenchymal transition: New and old insights from the classical neural crest model. *Semin Cancer Biol*, 22(5-6), 411-416. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.04.008
- Strobl-Mazzulla, P. H., & Bronner, M. E. (2012b). A PHD12-Snail2 repressive complex epigenetically mediates neural crest epithelial-to-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 198(6), 999-1010. doi: 10.1083/jcb.201203098
- Strobl-Mazzulla, P. H., Marini, M., & Buzzi, A. (2012). Epigenetic landscape and miRNA involvement during neural crest development. *Dev Dyn*, 241(12), 1849-1856. doi: 10.1002/dvdy.23868
- Strobl-Mazzulla, P. H., Sauka-Spengler, T., & Bronner-Fraser, M. (2010). Histone demethylase Jmjd2A regulates neural crest specification. *Dev Cell*, 19(3), 460-468. doi: S1534-5807(10)00384-9
- Sweetman, D. (2011). In situ detection of microRNAs in animals. *Methods Mol Biol*, 732, 1-8. doi: 10.1007/978-1-61779-083-6_1

- Taneyhill, L. A., Coles, E. G., & Bronner-Fraser, M. (2007). Snail2 directly represses cadherin6B during epithelial-to-mesenchymal transitions of the neural crest. *Development*, 134(8), 1481-1490. doi: 10.1242/dev.02834
- Taube, J. H., Malouf, G. G., Lu, E., Sphyris, N., Vijay, V., Ramachandran, P. P., . . . Mani, S. A. (2013). Epigenetic silencing of microRNA-203 is required for EMT and cancer stem cell properties. *Sci Rep*, 3, 2687. doi: 10.1038/srep02687
- Thevenneau, E., & Mayor, R. (2012). Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Dev Biol*, 366(1), 34-54. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.12.041
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871-890. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 2, Unit 2 3. doi: 10.1002/0471250953.bi0203s00
- Tsai, Y. H., Murakami, N., & Gariepy, C. E. (2011). Postnatal intestinal engraftment of prospectively selected enteric neural crest stem cells in a rat model of Hirschsprung disease. *Neurogastroenterol Motil*, 23(4), 362-369. doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01656.x
- Turner, D. P., Findlay, V. J., Moussa, O., & Watson, D. K. (2007). Defining ETS transcription regulatory networks and their contribution to breast cancer progression. *J Cell Biochem*, 102(3), 549-559. doi: 10.1002/jcb.21494
- Viticchiè, G., Lena, A. M., Latina, A., Formosa, A., Gregersen, L. H., Lund, A. H., . . . Melino, G. (2011). MiR-203 controls proliferation, migration and invasive potential of prostate cancer cell lines. *Cell Cycle*, 10(7), 1121-1131. doi: 10.4161/cc.10.7.15180

- Vogel, T., & Lassmann, S. (2014). Epigenetics: development, dynamics and disease. *Cell Tissue Res*, 356(3), 451-455. doi: 10.1007/s00441-014-1916-7
- Vrba, L., Munoz-Rodriguez, J. L., Stampfer, M. R., & Futscher, B. W. (2013). miRNA gene promoters are frequent targets of aberrant DNA methylation in human breast cancer. *PLoS One*, 8(1), e54398. doi: 10.1371/journal.pone.0054398
- Wang, X. (2008). miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA*, 14(6), 1012-1017. doi: 10.1261/rna.965408
- Wang, X., Zhao, J., Huang, J., Tang, H., Yu, S., & Chen, Y. (2012). The regulatory roles of miRNA and methylation on oncogene and tumor suppressor gene expression in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 425(1), 51-57. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.047
- Weber, B., Stresemann, C., Brueckner, B., & Lyko, F. (2007). Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*, 6(9), 1001-1005.
- Wienholds, E., Kloosterman, W. P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., de Bruijn, E., . . . Plasterk, R. H. (2005). MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*, 309(5732), 310-311. doi: 10.1126/science.1114519
- Wiklund, E. D., Kjems, J., & Clark, S. J. (2010). Epigenetic architecture and miRNA: reciprocal regulators. *Epigenomics*, 2(6), 823-840. doi: 10.2217/epi.10.51
- Wong, K. Y., Liang, R., So, C. C., Jin, D. Y., Costello, J. F., & Chim, C. S. (2011). Epigenetic silencing of MIR203 in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 154(5), 569-578. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08782.x

Wong, N., & Wang, X. (2014). miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gku1104

Zhang, J., Zhou, Y., Wu, Y. J., Li, M. J., Wang, R. J., Huang, S. Q., . . . Zhang, J. (2013). Hyper-methylated miR-203 dysregulates ABL1 and contributes to the nickel-induced tumorigenesis. *Toxicol Lett*, 223(1), 42-51. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.08.007

Zhang, Z., Zhang, B., Li, W., Fu, L., Fu, L., Zhu, Z., & Dong, J. T. (2011). Epigenetic Silencing of miR-203 Upregulates SNAI2 and Contributes to the Invasiveness of Malignant Breast Cancer Cells. *Genes Cancer*, 2(8), 782-791. doi: 10.1177/1947601911429743

10. Material suplementario

10. 1. ANEXO I - COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES

- **Agua DEPC:** todos los pasos se deben realizar en el flujo

DEPC 1 mL

Agua destilada (ddH₂O) 1L

Después de añadir el DEPC sacudir la botella abundantemente y dejar *overnigth*.

Autoclavar el siguiente día

- **10% BBR en MAB (no Tween-20):** 200mL

En un frasco de 1L:

180mL 1x MAB

20g BBR (Boehringer blocking reagent, ROCHE 11096176001)

Calentar a 70°C hasta disolver.

Autoclavar o calentar en el microondas.

Alicuotar en tubos de 10ml. Almacenar a -20°C

- **CuSO₄ 10x:** fungicida, 1L. Stock 10000p.p.m=1%

CuSO₄ 10g

Agua destilada 1L

- **EDTA (disodium ethylene-diamine-tetra-acetate) 0.5M pH=8:**

PM EDTA.Na₂.2H₂O 372.24

1M= 372.24g/L

0.5M=186.12g/L

EDTA-Na₂x2H₂O 74.43g

Agua destilada (ddH₂O) 400mL (colocar menos)

Ajuste el pH a 8 con NaOH 0.5M.

Será necesario echar mucho NaOH para cuadra el pH, solo cuando el pH está cercano a 8, la solución se disolverá.

Completar hasta el volumen deseado con ddH₂O. Autoclavar

- **Gelatina:** 20mL

En un beaker de 50mL

0.5x PBS	10mL
Sucrosa	3g
Gelatin from bovine skin	1.5g

Enrazar a volumen de 20mL con 0.5x PBS.

Cubrir con parafilm.

Remover con un bazo lentamente y calentar a no más de 40°C hasta que esté claro.

Guardar a 4°C

- **IPTG 0.1M (100mM):**

IPTG powder	0.238g
Agua destilada	10mL

Mezclar y luego alicuotar de a 500µl. Guardar a -20°C

- **5x MAB (uso: 1xMAB + 0.1% Tween-20):** 500Mm Maleic acid, 750mM NaCl, pH 7.5. Para 500mL

Maleic acid	29.025g
NaCl	21.92g
NaOH pellets	19.5g

Ajustar pH 7.5 con 10M NaOH, cuidadosamente pues pH vira rápidamente.

Autoclavar

Alicuotar en tubos de 1.5mL en un volumen de 500mL

Guardar a 4°C

- **5m NaCl:**

NaCl	292.2g
Agua destilada	1L

Calentar, máximo 80°C, hasta disolver.
Autoclavar.

- **NTMTw: (make fresh)**

50 mL		Concentración final
5 M NaCl	1 mL	100mM
1 M Tris.Hcl pH 9.5	5 mL	100mM
2 M MgCl ₂	1.25 mL	50mM
Tween-20	0.05 mL	0.1%
Enrazar a 50 mL.		

- **4% Paraformaldehido:** 1L, hacer todo en flujo con mascara y guantes.

El día antes de realizarlo poner una botella de agua destilada en la cámara fría.

En un beaker de 1L poner 600mL de agua destilada y calentar hasta 60-65°C, chequear con un termómetro.

Llegado a la temperatura adecuada agregar 40g de paraformaldehido.

Poner el buzo y comenzar a agitar.

Agregar 1-2 pellets de 10N NaOH por cada 100mL de agua destilada.

Agitar hasta que la solución esté clara.

Agregar 100mL de 10x PBS.

Enrazar con agua destilada entre 900-950 mL con agua destilada fría.

Cuando la solución esté fría, ajustar a pH 7.4 usando HCl.

Enrazar a 1L con agua destilada. (Si la solución forma precipitados, filtrar con filtro de 0.45um para obtener una solución clara).

Alicuotar y guardar a -20°C.

- **10x PBS: 1L**

Agua destilada	800mL	
NaCl (1.37M)	80g	
KCl (27mM)		2g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O (100Mm)		26.8g (Na ₂ HPO ₄ 15.4g)
KH ₂ PO ₄ (20mM)	2.4G	

Ajustar a pH 7.4 con HCl 1M. Enrazar a 1L. Autoclavar.

- **Proteinasa K:**

100 mg Proteinase K (ISC BioExpress cat # 0706)

10 ml Agua DEPC

Hacer alícuotas de 150µl y almacenar a –20°C.

- **Solución de pre-hibridación:**

<u>Final Concentration in Prehyb</u>	<u>Stock Concentration</u>
50% deionized formamide (ISC BioExpress cat # 0606)	25 ml
5x SSC pH 5	12.5 ml of 20x stock
2% blocking powder (Roche cat # 1 096 176)	1 g
0.1% Tween 20	250 µl of 20% stock
0.1% CHAPS (ISC BioExpress cat # 0465)	500 µl of 10% stock
0.5 mg/ml tRNA	1.25ml of mg/ml stock
5 mM EDTA	500 µl of 0.5M pH 8.0 stock
50 µg/ml heparin (Sigma cat # H3400)	50 µl of 50 mg/ml stock
DEPC treated water	10 ml
Total	50 ml

Calentar a 70°C hasta que se disuelva y luego almacenar a -20°C.

- **Soluciones de Miniprep:**

P1: Buffer de resuspensión (GTE)	P2: Buffer de lisis	P3: Buffer de neutralización
50mM Glucosa	200mM NaOH	3M AcK pH 4.8
50mM Tris/HCl pH 8	1% SDS	
10mM EDTA pH8	Hacer fresco	

- **SDS (sodium dodecyl sulfate or lauryl sulphate):**

Hacer stock de SDS un día antes de usar pues el SDS se disuelve lentamente.

SDS-sodium salt 1% - 1g/100mL (C₁₂H₂₅O₄₅Na) PM 288.4

SDS 20% (200g -> 1L H₂O) SDS 10% (100g -> 1L H₂O)

Ser extremadamente cuidadoso cuando se pesa el SDS pues es extremadamente higroscópico y puede dañar las vías respiratorias. Por ende, siempre utilizar mascara y hacerlo en el flujo.

Agregar el SDS al volumen de agua deseada.

Nunca mezclar con un bazo magnético, pues genera precipitación y evaporación dañina para el tracto respiratorio.

Dejas que el SDS solo se disuelva, o mezclar por abundante agitación hasta que se disuelva; se puede calentar gentilmente hasta disolver. No es necesario autoclavar.

- **20x SSC:** 200mL, para hibridación, libre de RNAsa/DNAsa

Sodium citrate-tribasic dihydrate ($C_6H_5NA_3O_7 \cdot 2H_2O$) PM->244.1

NaCl 35g

Sodium Citrate 17g

Ajustar pH 5 con 1M citric acid

Enrazar a volumen deseado con agua DEPC

Autoclavar.

SSC con CHAPS:

2x SSC with 0.1% CHAPS:

2x SSC	10 ml of 20x SSC
0.1% CHAPS	1 ml of 10% CHAPS
distilled water	89 ml
total	100 ml

0.2x SSC with 0.1% CHAPS:

0.2x SSC	1 ml 20x SSC
0.1% CHAPS	1 ml 10% CHAPS
distilled water	98 ml
total	100 ml

- **5% Sucrose:** 20mL

Sucrose 1g

Agua destilada 18mL

10x PBS 2mL

Mezclar sin calentar

- **15% Sucrose:** 20mL

Sucrose 3g

Agua destilada 18mL

10x PBS 2mL

Mezclar sin calentar

- **50x TAE:** electrophoresis *buffer*, stock solution 500mL. 1x TAE: working solution

Tris base 121g

Ácido acético glacial 28.55g

EDTA 0.5M pH 8 50mL

Enrazar hasta el volumen deseado

- **TE *buffer*:** pH 7.5 o 8. 400mL

Tris 1M pH 7.5 o 8	4mL
EDTA 0.5M pH 8	0.8mL

El pH final de la solución está dado por el pH de la solución de Tris 1M usada.

Enrazar al volumen deseado. Autoclavar

- **10x TBE:** solución stock, electroforesis *buffer*. 1L

0.5-1x TBE: working solution [Diluir en agua DEPC cuando son geles de ARN]

Tris base	108g	
Ácido bórico	55g	
EDTA 0.5M pH 8		40mL

Enrazar al volumen deseado.

Cuando se guarda el TBE por un periodo largo de tiempo, un precipitado se formará. Para evitar problemas, guardar la solución concentrada en menor volumen a temperatura ambiente; cuando se produzca precipitados, descartar.

- **10x TBS (Tris-buffered saline):** solución stock. 500ml

TrisHCl 1M pH 7.4	250ml (500mM)
NaCl 5M	150ml (1.5M)
CaCl ₂ (powder)	0.735g (10mM)
Agua destilada	100ml

- **Tris-HCl 1M:** *buffer* solution, 400mL

Tris (hydroxyethyl)-aminomethane $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$
PM=121.14 1M-> 121.14g/l

Tris-base	48.43g
-----------	--------

Ajustar al pH deseado con HCl 1M

El pH de esta solución depende de la temperatura (decrece aproximadamente 0.03 unidades por cada 1°C que aumenta) por ello dejar que la solución enfríe a temperatura ambiente antes de ajustar el pH.

Enrazar al volumen deseado y autoclavar.

- **4% X-gal (40mg/mL):** en flujo

X-gal powder	200mg
Dimetofomamide	5mL

Mezclar

Alicuotar de a 500µl en tubos con papel aluminio

Guardar a -20°C

10. 2. ANEXO II - COMPOSICIÓN MEDIOS DE CULTIVO

- **Medio LB (Luria broth):** 400mL

Bacto tryptone	4g
Yeast extract	2g
NaCl	4g

Ajustar a pH 7 con 5N NaOH. Completar hasta el volumen deseado.

Autoclavar.

LB-agar (400mL)

Agregar 6g de agar bacteriológico a la solución anterior.

Es crucial enfriar el LB-agar hasta 55°C antes de agregar el antibiótico.

Carbenicillin, kanamycin: concentración necesaria = 50ug/mL(1x); de un stock de 50mg/mL (1000x)

Ampicillin: concentración necesaria = 100ug/mL(1x); de un stock de 100mg/mL (1000x)

- **Ringer's:** 1L

Agua destilada	800mL
NaCl	7.2g
CaCl ₂	0.17g (CaCl ₂ .2H ₂ O 0.225g)
KCl	0.37g
Na ₂ HPO ₄	0.115g
KH ₂ PO ₄	0.02g

Ajustar a pH 7.4 con 5N NaOH. Enrazar al volumen deseado

Filtrar 0.22µm en quitasato. Alicuotar en botellas de 250 y 100L.

10. 3. Tablas suplementarias

Nombre común	Nombre científico	Abreviatura
Camaleón de Carolina	<i>Anolis carolinensis</i>	aca
Carpa común	<i>Cyprinus carpio</i>	ccr
Chimpancé	<i>Pan troglodytes</i>	ptr
Colicorto común	<i>Monodelphis domestica</i>	mdo
Falso halibut del Japón	<i>Paralichthys olivaceus</i>	pol
Gallo	<i>Gallus gallus</i>	gga
Hombre	<i>Homo sapiens</i>	hsa
Lamprea	<i>Petromyzon marinus</i>	pma
Macaco	<i>Macaca mulatta</i>	mml
Medaka común	<i>Oryzias latipes</i>	ola
Orangután	<i>Pongo pygmaeus</i>	ppy
Perro	<i>Canis familiaris</i>	cfa
Pez cebra	<i>Danio rerio</i>	dre
Pez globo	<i>Fugu rubripes</i>	fru
Pinzón cebra	<i>Taeniopygia guttata</i>	tgu
Puffer moteado	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	tni
Rana	<i>Xenopus tropicalis</i>	xtr
Rata	<i>Rattus norvegicus</i>	rno
Ratón	<i>Mus musculus</i>	mmu

Tabla suplementaria 1: Especies utilizadas para el análisis de la conservación del gen miR-203. Las secuencias del miR-203 de las 22 especies se obtuvieron de la base de datos: miRBase (<http://www.mirbase.org/>); se muestran el nombre común de las especies ordenadas alfabéticamente, además del nombre científico y las abreviaturas utilizadas en la imagen 10.